

Entwicklung und Charakterisierung von Nanosuspensionen
auf Basis erstarrter invers mizellarer Lösungen (SRMS)
als ophthalmologisches Drug Delivery System

Von der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr.rer.nat.)

genehmigte
Dissertation

von Ingo Friedrich
aus Wolfsburg

1. Referentin oder Referent:	Prof. Dr. C.C. Müller-Goymann
2. Referentin oder Referent:	Prof. Dr. K. Mäder
eingereicht am:	13. September 2004
mündliche Prüfung (Disputation) am:	13. Dezember 2004

Druckjahr	2005
-----------	------

Meinen Eltern

Allwissend bin ich nicht;
doch viel ist mir bewusst.

Mephistopheles
in Goethes Faust, Der Tragödie Erster Teil

Die vorliegende Arbeit entstand unter der Anleitung von Frau Prof. Dr. Christel C. Müller-Goymann am Institut für Pharmazeutische Technologie der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig.

Frau Prof. Dr. Christel C. Müller-Goymann

danke ich herzlich für die Zuweisung des Themas, die mir erwiesene Unterstützung bei dessen Bearbeitung, die ständige Diskussionsbereitschaft und die persönliche Betreuung.

Herrn Prof. Dr. Karsten Mäder danke ich für die Anfertigung des Zweitgutachtens.

Bei Herrn Prof. Dr. Rolf Daniels möchte ich mich für den freundlichen Umgang und nette Gespräche, aber auch für gute fachliche Diskussionen bedanken.

Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Institutes möchte ich für zahlreiche Diskussionen, Anregungen und die mir stets gewährte Hilfe sowie für die herzliche und angenehme Arbeitsatmosphäre danken. Dies hat zu einem nicht unerheblichen Teil zum Gelingen der Arbeit beigetragen. Mein besonderer Dank gilt hierbei Frau Manuela Handt für ihre Messungen und die Unterstützung bei der Herstellung der Systeme, Herrn Dr. Stefan Gottbrath für die Einarbeitung am TEM und Herrn Dr. Stephan Reichl für die kritische Durchsicht der Arbeit.

Bei Herrn Dr. Alexander Brämer bedanke ich mich für vier angenehme und sehr freundschaftliche Jahre im gemeinsamen Labor mit vielen fachlichen Diskussionen und solche über Gott und die Welt, Frotzeleien und herzlichem und lautem Humor. Es war eine schöne Zeit!

Herrn Dr. Robert Hänsch vom Institut für Pflanzenbiologie sowie Herrn Hanno Dierke vom Institut für Metallphysik und Nukleare Festkörperphysik der TU Braunschweig danke ich für die Möglichkeit, Untersuchungen am TEM durchzuführen.

Ferner möchte ich den, in Abschnitt 3.1 aufgeführten, Firmen für die freundliche Überlassung von Untersuchungsmaterialien danken.

Mein allerherzlichster Dank gilt Frau Juliane-Mareike Schermer für jede Art von Unterstützung und das fleißige Korrekturlesen.

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät, vertreten durch Frau Prof. Dr. C.C. Müller-Goymann, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen

Friedrich I., Müller-Goymann C.C., Characterization of solidified reverse micellar solutions (SRMS) and production development of SRMS-based nanosuspensions, Eur. J. Pharm. Biopharm. 56 (2003) 111-119

Friedrich I., Reichl S., Müller-Goymann C.C., Drug release and permeation studies of nanosuspensions based on solidified reverse micellar solutions (SRMS), Int. J. Pharm. (eingereicht)

Tagungsbeiträge

Friedrich I., Müller-Goymann C.C., Solid reverse micellar solutions – the influence of lecithin on solid lipid properties (Poster), Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft (DPhG), Halle/Saale (2001)

Friedrich I., Müller-Goymann C.C., Nanosuspensions based on solid reverse micellar solutions (SRMS) - a homogenization screening (Poster), 4th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics, Pharmaceutical Technology, APV-APGI-ADRITELF, Florenz/Italien (2002)

Friedrich I., Müller-Goymann C.C., Thermal analysis of nanosuspensions based on solidified reverse micellar solutions (SRMS) (Poster), 2nd Congress of the European Federation for the Science and Technology of Lipids, Strasburg/Frankreich (2002)

Friedrich I., Müller-Goymann C.C., Entwicklung und Charakterisierung estradiolhaltiger Nanosuspensionen auf Basis erstarrter invers mizellarer Lösungen (SRMS) (Vortrag), Doktorandentagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft (DPhG), Düsseldorf (2003)

Friedrich I., Müller-Goymann C.C., Estradiol release from nanosuspensions based on solidified reverse micellar solutions (SRMS) (Poster), Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft (DPhG), Würzburg (2003)

Friedrich I., Müller-Goymann C.C., Hydrocortisone loaded nanosuspensions based on solidified reverse micellar solutions (SRMS) (Vortrag), International Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics, Pharmaceutical Technology 2004, APV, Nürnberg (2004)

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

A	Fläche
AS	Arzneistoff
$c/c_0/c_s$	Konzentration, Ausgangs-, Sättigungs-
CC	Kühlschlange bei der Hochdruckhomogenisation
CP980	Carbopol 980
δ	Phasenwinkel
d	Durchmesser, Tag
D	Diffusionskoeffizient, Schergefälle
D_s	Scheinbarer Diffusionskoeffizient
DC	Dünnschichtchromatographie
DSC	Dynamische Differenzkalorimetrie
EIS	Eisbadkühlung bei der Hochdruckhomogenisation
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
EST	17 β -Estradiol-Hemihydrat
χ	Schergefälle
G	Erdbeschleunigung
G'	Elastischer Modul
G''	Viskoser Modul
η	Dynamische Viskosität
η_0	Dynamische Viskosität des Dispersionsmittels
$\eta_{\text{spez.}}$	Spezifische Viskosität
$[\eta]$	Intrinsische Viskosität
h	Stunde
HC	Hydrocortison
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie
J	Flux
k	Boltzmann-Konstante, Gerätekonstante
λ	Wellenlänge
m	Masse
MAI	Mucoadhäsiver Index
min	Minute
MUC	Mucin-Dispersion (16 % (m/m) in SLF)
MWCO	Molecular Weight Cut Off
ν	Kinematische Viskosität
n	Anzahl der Versuche
P	Leistung, Permeationskoeffizient
P90G	Phospholipon 90G
PB	Pilocarpin-Base

PBS	Isotonischer, salinischer Phosphatpuffer
PCS	Photonenkorrelationsspektroskopie
φ	Volumenanteil
PHCl	Pilocarpinhydrochlorid
PI	Polydispersitätsindex
PS80	Polysorbat 80
PVA	Polyvinylalkohol
PVP	Polyvinylpyrrolidon
Q	Freigesetzte Menge Arzneistoff
ρ	Dichte
r	Radius
R	Korrelationskoeffizient
RP	Reversed phase
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
S100	Softisan 100
S142	Softisan 142
SLF	Künstliche Tränenflüssigkeit
SLN	Feste Lipidnanopartikel
SLP	Feste Lipidpartikel
SRMS	Erstarrte invers Mizellare Lösung (Mischung aus P90G und Hartfett)
SRMS100	Mischung aus P90G und S100 (1:1 (m/m))
SRMS142	Mischung aus P90G und S142 (1:1 (m/m))
τ	Schubspannung
θ	Halber Beugungswinkel
t	Zeit
T	Temperatur
$T_{\text{Schm.}}$	Schmelzpunkt
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
V	Volumen
WAXD	Röntgenweitwinkeldiffraktometrie
wf.	Wasserfrei
ζ	Zetapotential
z-average	Intensitätsgewichteter, mittlerer Teilchendurchmesser (PCS)

Warenrechtlich geschützte Namen werden in dieser Arbeit ohne besondere Kennzeichnung verwendet. Aus dem Fehlen eines solchen Hinweises kann nicht geschlossen werden, dass es sich um einen freien Warennamen handelt.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Problemstellung	1
2	Allgemeiner Teil	3
2.1	Das Auge	3
2.1.1	Anatomie des Augapfels	3
2.1.2	Die Cornea	4
2.2	Ausgewählte Erkrankungen des Auges und ihre Therapie	6
2.2.1	Glaukom	6
2.2.1.1	Therapie des Glaukoms	7
2.2.2	Keratokonjunktivitis sicca	9
2.2.2.1	Therapie der Keratokonjunktivitis sicca	10
2.2.3	Entzündliche Erkrankungen des Auges	11
2.2.3.1	Therapie entzündlicher Erkrankungen des Auges	12
2.3	Arzneiformen zur ophthalmologischen Applikation	13
2.3.1	Arzneibuchmonographie	13
2.3.2	Galenische Aspekte bei Augenarzneimitteln	14
2.3.3	Spezielle Drug Delivery Systeme zur ophthalmologischen Anwendung	15
2.4	Feste Lipidnanopartikel	18
2.4.1	Geschichte	18
2.4.2	Herstellung	18
2.4.2.1	Mikroemulsionstechnik	19
2.4.2.2	Solvent Injection	19
2.4.2.3	Rotor-Stator-Homogenisation und Ultraschall	19
2.4.2.4	Hochdruckhomogenisation	20
2.4.3	Eigenschaften fester Lipidnanopartikel	22
2.4.4	Beladung fester Lipidnanopartikel mit Arzneistoffen	23

2.5	Hochdruckhomogenisation	25
2.5.1	Prinzip	25
2.5.2	Auftretende Kräfte und Parameter der Hochdruckhomogenisation	27
3	Material und Methoden	28
3.1	Material	28
3.1.1	Arzneistoffe	28
3.1.2	Rezepturgrundstoffe	28
3.2	Methoden	32
3.2.1	Herstellung von erstarrten invers mizellaren Lösungen (SRMS)	32
3.2.2	Bestimmung der Arzneistoffsolubilisation in den SRMS	32
3.2.3	Herstellung von Nanosuspensionen (Entwicklung)	32
3.2.4	Herstellung der Nanosuspensionen (optimiertes System)	34
3.2.5	Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) gefriergebrochener und replizierter Proben	34
3.2.6	Polarisationsmikroskopie	35
3.2.7	Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS)	35
3.2.8	Bestimmung des Zetapotentials	35
3.2.9	Röntgenweitwinkeldiffraktometrie (WAXD)	36
3.2.10	Dynamische Differenzkalorimetrie (DSC)	36
3.2.11	pH-Wert-Bestimmung	37
3.2.12	Bestimmung der Osmolalität	37
3.2.13	Dichtebestimmung	37
3.2.14	Kapillarviskosimetrie	37
3.2.15	Rotationsviskosimetrie	38
3.2.16	Oszillationsrheologische Untersuchungen mucoadhäsiver Effekte	38
3.2.17	HPLC-Bestimmung der Arzneistoffe	39
3.2.18	ELISA-Bestimmung von Estradiol	40
3.2.19	Bestimmung der Beladungskapazität	41
3.2.20	Freisetzungsuntersuchungen	41

3.2.21	Permeationsuntersuchungen	43
3.2.22	Prüfung auf signifikante Unterschiede von Mittelwerten (t -Test)	43
4	Versuchsergebnisse und Diskussion	44
4.1	Überlegungen zur Modellauswahl	44
4.2	Charakterisierung von Lecithin-Hartfett-Mischungen	45
4.2.1	Charakterisierung arzneistofffreier Lecithin-Hartfett-Mischungen	45
4.2.1.1	Herstellung der Lecithin-Hartfett-Mischungen	45
4.2.1.2	DSC-Untersuchungen von Lecithin-Hartfett-Mischungen	45
4.2.1.3	Röntgenuntersuchungen (WAXD) von Lecithin-Hartfett-Mischungen	49
4.2.1.4	Untersuchung gelagerter Lecithin-Hartfett-Mischungen	53
4.2.1.5	Polarisationsmikroskopische Untersuchungen von Lecithin-Hartfett-Mischungen	55
4.2.1.6	Elektronenmikroskopische Untersuchungen von Lecithin-Hartfett-Mischungen	57
4.2.1.7	Partikelgrößenbestimmung in Lecithin-Hartfett-Mischungen mittels Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS)	61
4.2.2	Charakterisierung arzneistoffhaltiger Lecithin-Hartfett-Mischungen	62
4.2.2.1	Herstellung	62
4.2.2.2	Solubilisationsversuche	62
4.2.2.3	DSC-Untersuchungen estradiolhaltiger Systeme	64
4.2.2.4	Röntgenuntersuchungen (WAXD) estradiolhaltiger Systeme	65
4.2.2.5	Mikroskopische Untersuchungen pilocarpinhaltiger Systeme	67
4.2.3	Zusammenfassende Diskussion der Ergebnisse der physiko-chemischen Charakterisierung von Lecithin-Hartfett-Mischungen	69
4.3	Entwicklung SRMS basierter Nanosuspensionen	72
4.3.1	Einfluss des Emulgators auf Partikelgrößen und Stabilität der Nanosuspensionen	72
4.3.1.1	Stabilisierung mit Poloxamer 188	72
4.3.1.2	Stabilisierung mit Polysorbat 80	73
4.3.2	Optimierung des Homogenisierprozesses	76

4.3.3	Zusammenfassende Diskussion der Ergebnisse der Entwicklung SRMS basierter Nanosuspensionen	80
4.4	Charakterisierung arzneistofffreier SRMS basierter Nanosuspensionen	82
4.4.1	Elektronenmikroskopische Untersuchungen von Nanosuspensionen	82
4.4.2	Kapillarviskosimetrische Untersuchungen verdünnter Nanosuspensionen	86
4.4.3	Untersuchungen zur Kristallinität der Nanopartikel	88
4.4.3.1	DSC-Untersuchungen von Nanosuspensionen	88
4.4.3.2	Röntgenuntersuchungen (WAXD) von Nanosuspensionen	90
4.4.4	Korrelation thermoanalytischer Daten mit den Partikelgrößen	91
4.4.5	Bestimmung des Zetapotentials und des pH-Wertes der Nanosuspensionen	93
4.4.6	Rheologische Untersuchungen carbopolfreier und -haltiger Nanosuspensionen	94
4.4.6.1	Rotationsviskosimetrie	95
4.4.6.2	Oszillationsrheologische Untersuchungen mucoadhäsiver Effekte	99
4.4.7	Zusammenfassende Diskussion der Ergebnisse der Charakterisierung arzneistofffreier SRMS basierter Nanosuspensionen	103
4.5	Arzneistoffbeladung und Charakterisierung arzneistoffhaltiger SRMS basierter Nanosuspensionen	105
4.5.1	Herstellung arzneistoffhaltiger Nanosuspensionen	105
4.5.1.1	Pilocarpin-Base	105
4.5.1.2	Estradiol	106
4.5.1.3	Hydrocortison	108
4.5.2	Charakterisierung arzneistoffhaltiger Nanosuspensionen	109
4.5.2.1	Bestimmung des Zetapotentials arzneistoffhaltiger Nanosuspensionen	109
4.5.2.2	Elektronenmikroskopische Untersuchungen arzneistoffhaltiger Nanosuspensionen	109
4.5.2.3	Bestimmung der Beladungskapazität	111

4.5.3	Permeationsuntersuchungen	112
4.5.3.1	Pilocarpin	112
4.5.3.2	Hydrocortison	114
4.5.3.3	Estradiol	117
4.5.4	Freisetzungsuntersuchungen estradiolhaltiger Systeme	118
4.5.5	Zusammenfassende Diskussion der Ergebnisse der Arzneistoffbeladung und Charakterisierung arzneistoffhaltiger SRMS basierter Nanosuspensionen	123
5	Abschlussdiskussion	126
5.1	Charakterisierung von Lecithin-Hartfett-Mischungen	126
5.1.1	Einfluss von Lecithin auf physikochemische Eigenschaften von Hartfetten	126
5.1.2	Nachweis inverser Mizellen	128
5.1.3	Solubilisation von Arzneistoffen in der SRMS	128
5.2	Entwicklung SRMS basierter Nanosuspensionen	129
5.3	Charakterisierung arzneistofffreier SRMS basierter Nanosuspensionen	131
5.3.1	Form der Partikel	131
5.3.2	Kristallinität der Partikel	131
5.3.3	Rheologische Untersuchungen der Nanosuspensionen	132
5.4	Arzneistoffbeladung und Charakterisierung arzneistoffhaltiger SRMS basierter Nanosuspensionen	133
5.4.1	Herstellung der Nanosuspensionen und Bestimmung ihrer Beladungskapazität	133
5.4.2	Untersuchungen zur Permeation von Arzneistoffen aus den Nanosuspensionen	135
5.4.3	Untersuchungen zur Freisetzung aus estradiolhaltigen Systemen	136

6	Zusammenfassung	137
7	Literaturverzeichnis	139

1 Einleitung und Problemstellung

Arzneistoffe zur ophthalmologischen Anwendung müssen, wie z.B. das bei Glaukom indizierte Pilocarpin, oftmals 2-4mal täglich appliziert werden [Rote Liste 2004]. Dagegen sind schwer lösliche Arzneistoffe zur topischen Applikation, wie das Estrogen Estradiol und das Glucocorticoid Hydrocortison, zumeist nur als halbfestes System oder als ölige Lösung formulierbar [Rote Liste 2004]. Aufgrund der mangelnden Akzeptanz dieser halbfesten Formulierungen und öligen Lösungen als Augenarzneimittel und da auch das häufige Eintropfen wässriger Lösungen der Compliance des Patienten abträglich ist, ist das Ziel dieser Arbeit die Entwicklung eines alternativen, wässrigen Systems mit, für den Patienten, verbesserten Eigenschaften.

Als verbesserte Eigenschaften werden die niedrige Viskosität wässriger Systeme, die auch für schwer lösliche Arzneistoffe erzielt werden soll, mit einer entsprechenden guten Handhabbarkeit angesehen, sowie eine verlängerte Freisetzung von Arzneistoffen, um das Applikationsintervall zu erweitern. Als System werden Lipidnanosuspensionen, d.h. feste Lipidnanopartikel, gewählt, wobei dieses disperse System nicht auf einer simplen Triglyceridmatrix, sondern auf erstarrten invers mizellaren Lösungen (SRMS) basieren soll.

Invers mizellare Lösungen aus Lecithin in öligen Vehikeln transformieren bei Kontakt mit Wasser in einen lamellaren Flüssigkristall [Hamann 1990] und bieten so die Möglichkeit einer kontrollierten Freisetzung inkorporierter Arzneistoffe [Müller-Goymann und Hamann 1993]. Ein festes Analogon verhält sich ebenso, wenn es am Applikationsort schmilzt [Schneeweis und Müller-Goymann 2000]. Zudem bieten diese invers mizellaren Lösungen den Vorteil, Arzneistoffe unterschiedlicher Art gut solubilisieren zu können [Papantoniou und Müller-Goymann 1995a].

Die Verweilzeit am Auge ist, falls ein System mit verlängerter Wirkstofffreisetzung appliziert wird, der limitierende Faktor bei der Bioverfügbarkeit. Daher sollten die zu entwickelnden Nanosuspensionen mit der Mucin-Schicht des Auges interagieren, um so ein viskoses System am Auge in situ zu bilden.

Drei, in der Ophthalmologie verwendete, Modellarzneistoffe werden für die vorliegende Arbeit ausgewählt. Zum einen Pilocarpin, das als Base und Hydrochlorid eher hydrophil ist und mehrmals täglich appliziert werden muss. Zum anderen werden Estradiol und Hydrocortison untersucht, die beide in die Gruppe schwer löslicher Arzneistoffe einzuordnen sind.

Aus den oben genannten Aspekten ergeben sich als Ziele dieser Arbeit:

1. Die Entwicklung und physikochemische Charakterisierung geeigneter Lecithin-Hartfett-Mischungen, die als Lipidmatrix für die Nanosuspensionen fungieren sollen, und in die die Arzneistoffe inkorporiert werden.
2. Die Entwicklung und physikochemische Charakterisierung von Lipidnanosuspensionen auf Basis der untersuchten erstarrten invers mizellaren Lösungen (SRMS).
3. Die Beladung der entwickelten SRMS basierten Nanosuspensionen mit den gewählten Modellarzneistoffen und Charakterisierung dieser arzneistoffhaltigen Systeme hinsichtlich ihrer Beladungskapazität sowie ihres in vitro Permeations- und Freisetzungsverhaltens.

2 Allgemeiner Teil

2.1 Das Auge

Mit Hilfe des optischen Systems werden im Auge Objekte der Umwelt auf der Netzhaut abgebildet. Die Hornhaut und die Linse gehören als brechende Medien zu den bildentwerfenden Abschnitten des Auges, der bildaufnehmende Teil ist die Netzhaut. In ihr werden physikalische Reize durch photochemische Prozesse in Erregungen umgewandelt, die ihrerseits über den Sehnerven in das Sehzentrum im Hinterhauptslappen des Großhirns weitergeleitet werden [Thews et al. 1991].

2.1.1 Anatomie des Augapfels

Der Augapfel oder Bulbus oculi (Abbildung 2.1) besitzt, von der stärkeren Krümmung der Hornhaut abgesehen, eine nahezu kugelförmige Gestalt. Seine Wand besteht aus den drei Hauptschichten äußere Augenhaut (Tunica externa), mittlere Augenhaut (Tunica media) und innere Augenhaut (Tunica interna), wobei die beiden äußeren Schichten mesenchymaler Herkunft sind und die innere Schicht sich aus der Augenblase, einem vorgeschobenen Teil des Zwischenhirns, entwickelt [Thews et al. 1991].

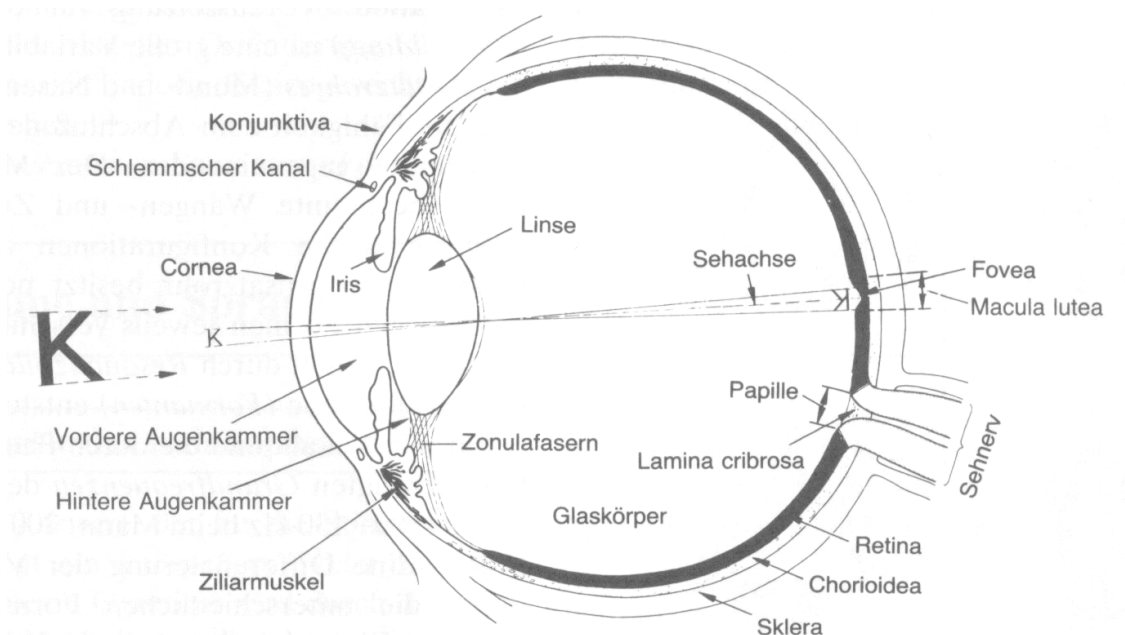


Abbildung 2.1: Horizontalschnitt durch das rechte Auge in schematischer Darstellung [Grüsser und Landis 1991].

Die äußere Augenhaut besteht aus der derben, undurchsichtigen Sclera (Lederhaut) und der durchsichtigen Cornea (Hornhaut). Die weiße Sclera ist eine dicke, dehnungsfeste Bindegewebskapsel, die vorwiegend aus kollagenen Fasern aufgebaut ist und die Form des Bulbus aufrechterhält. Dies wird auch durch den Augeninnendruck unterstützt. Im vorderen Abschnitt ist die Sclera von der Bindehaut (Konjunctiva) überzogen. Der vordere Abschnitt des Augapfels, der von der Bindehaut nicht bedeckt ist, enthält die durchsichtige Cornea, die wie ein Uhrglas in die Sclera eingelassen ist und, wie diese, eine derbe Konsistenz hat.

Die mittlere Augenhaut (Uvea) beinhaltet die Chorioidea (Aderhaut), den Ziliarkörper (Corpus ciliare) sowie die Regenbogenhaut (Iris). Die Aderhaut ist der Sclera innen angelagert und besteht aus mehreren Schichten. Im vorderen Abschnitt des Auges bildet die mittlere Augenhaut den Ziliarkörper. Dieser enthält die glatten Muskelfasernzüge des Ziliarmuskels (M. ciliaris), der den Krümmungsradius der Linse reguliert. An der Basis des Ziliarkörpers schließt sich nach vorn die Iris an, die die vordere Augenkammer von der kleineren, ringförmig um die Linse liegenden, hinteren Augenkammer trennt. Die vordere Augenkammer ist ein, mit Kammerwasser gefüllter, Raum zwischen der Hornhaut und der Vorderfläche von Iris und Linse. Im Zentrum der Iris ist die Pupille lokalisiert, die durch die glatten Muskeln der Iris (M. sphincter pupillae und M. dilatator pupillae) veränderbar ist. Je nach Intensität des Lichteinfalls wird reflektorisch die Pupillenweite reguliert.

Die innere Augenhaut besteht aus der Netzhaut (Retina) und wird in das vordere, lichtunempfindliche Pars caeca und das hintere, lichtempfindliche Pars optica gegliedert. Die Pars optica besteht aus zwei Blättern, dem Pigmentepithel (Stratum pigmentosum), das hauptsächlich der Ernährung der Rezeptorzellen dient, und dem Stratum nervosum, das den eigentlichen lichtempfindlichen Teil der Retina darstellt und somit maßgeblich am Sehvorgang beteiligt ist [Thews et al. 1991].

2.1.2 Die Cornea

Im Gegensatz zur Sclera ist die Cornea (Abbildung 2.2) ein gefäßloses Gewebe, das im vorderen Augenabschnitt die vordere Augenkammer von der Luftumgebung abtrennt. Sie erfüllt damit eine Schutzfunktion und ist die Hauptbarriere für Arzneistoffe, die ins Auge eindringen sollen. Als Gewebe, das durch den richtigen Hydratationsgrad des Stromas, seine Formkonstanz und fehlende Gefäße eine hohe Transparenz aufweist, bildet die Cornea einen Teil des optischen Systems [Rohen 1996].

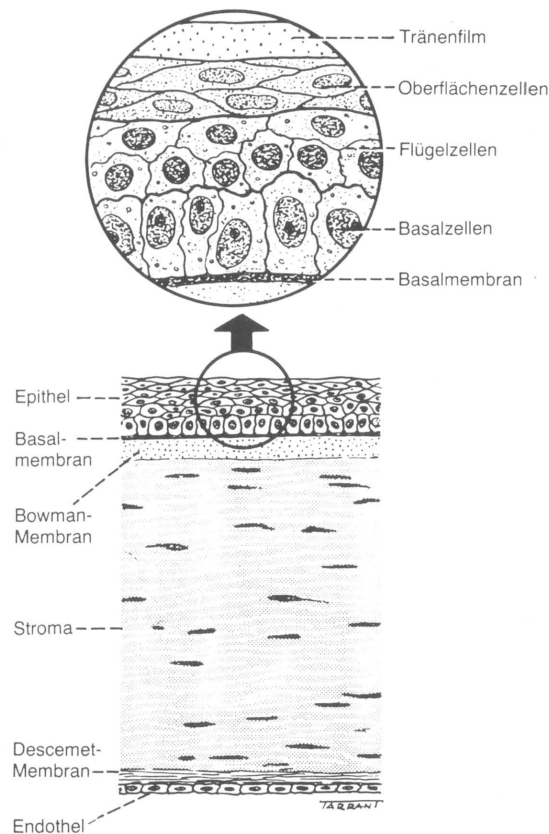


Abbildung 2.2: Anatomie der Hornhaut [Kanski und Spitznas 1987].

Die Hornhaut ist eine konvex-konkave Linse mit einem Krümmungsradius von 7-8 mm und einem durchschnittlichen Durchmesser von 11,6 mm, wobei die Cornea eine anisometrische Form aufweist [Kühnel und Mendoza 1987]. Die Dicke der Cornea wird von Barraquer und Rutllán (1991) mit 0,58 mm im Zentrum bzw. 0,67 mm in den Randgebieten angegeben. Die humane Hornhaut besitzt, wie in Abbildung 2.2 dargestellt, einen sechsschichtigen Aufbau. Eine Basalmembran ist ein mehrschichtiges Epithel (Dicke etwa 50-60 μm) aufgelagert. Unter der Basalmembran befindet sich die sogenannte Bowman-Membran (Dicke etwa 7-14 μm), an die sich das Stroma anschließt. Dieses besteht aus 200-250 übereinander liegenden Lamellen (Dicke etwa 2 μm) aus kollagenen Fibrillen. In die Grundsubstanz sind Keratozyten eingebettet. Das Stroma wird nach innen von der Descemet-Membran begrenzt, an die sich das einschichtige Endothel als Abdeckung gegen die vordere Augenkammer anschließt [Kühnel und Mendoza 1987].

2.2 Ausgewählte Erkrankungen des Auges und ihre Therapie

Die untersuchten Modellarzneistoffe Pilocarpin, Estradiol und Hydrocortison sind bei Erkrankungen indiziert, die im Folgenden erläutert werden.

2.2.1 Glaukom

Das Glaukom (Grüner Star) ist eine pathologische Steigerung des Augeninnendrucks auf Werte über 26 mm Hg. In den meisten Fällen liegt dabei eine Abflussbehinderung des Kammerwassers zugrunde. Tritt die Drucksteigerung als erstes und zunächst einziges Zeichen einer Augenerkrankung auf, wird von einem primären Glaukom gesprochen, das in 80-90 % aller Fälle auftritt [Bonomi et al. 1998], während beim sekundären Glaukom die Erhöhung des Augeninnendrucks die Folge einer bestehenden oder vorausgegangenen Augenerkrankung, z.B. einer intraokularen Entzündung, ist. Das primäre Glaukom wird, wie in Abbildung 2.3 dargestellt, nach der Weite des Kammerwinkels in das Weitwinkel- und das Engwinkelglaukom unterteilt [Thews et al. 1991].

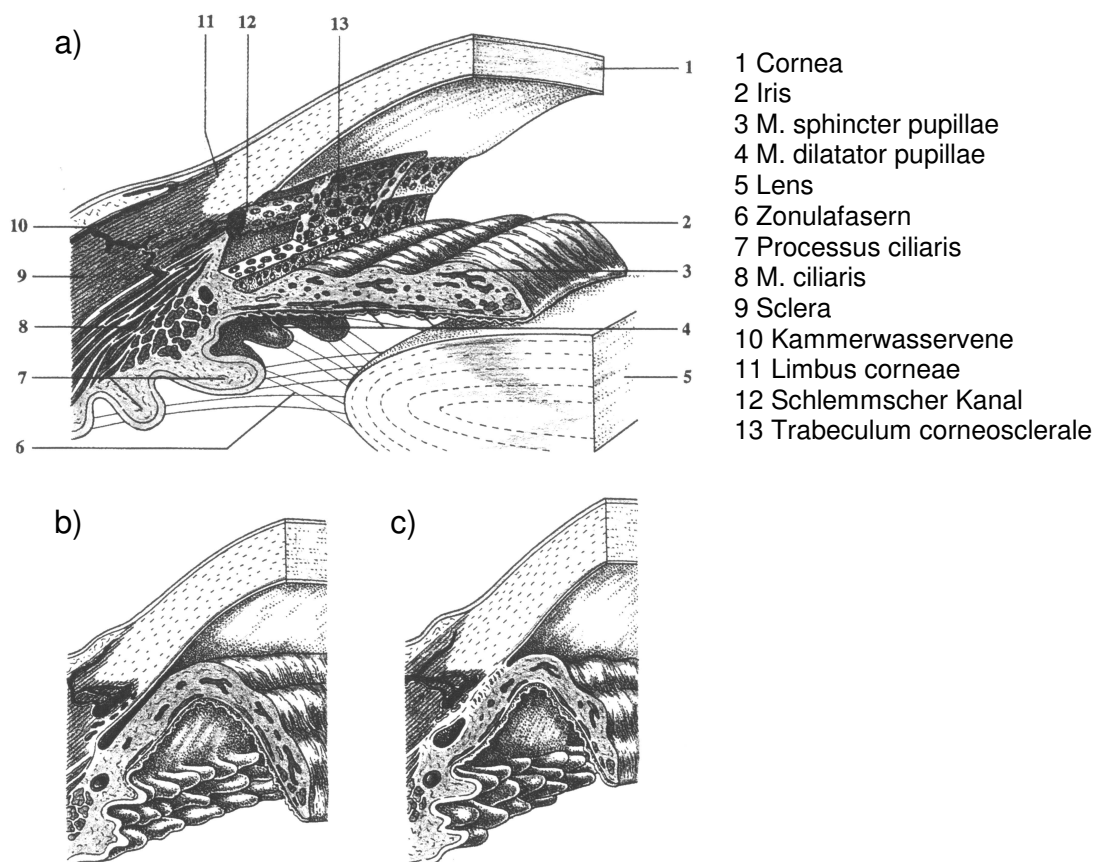


Abbildung 2.3: Schema der Kammervhältnisse bei a) normalem b) engem und c) verschlossenem Kammerwinkel [Beck und Langhage 1995].

Beim Weitwinkelglaukom (Glaucoma simplex), das die häufigste Form des primären Glaukoms, insbesondere mit zunehmendem Alter, darstellt [Wensor et al. 1998], kann das Kammerwasser das Trabekelmaschenwerk durch den weiten Kammerwinkel zwar ungehindert erreichen, infolge struktureller Veränderungen der Trabekel jedoch nur schwer hindurch treten. Weitere Abflusshindernisse können ein erhöhter Widerstand im Schlemmschen Kanal sowie eine Drucksteigerung in den Venen, die das Kammerwasser ableiten, sein. Im Allgemeinen ist die Drucksteigerung nicht sehr ausgeprägt und die tageszeitlichen Druckschwankungen sind gering [Thews et al. 1991].

Die Steigerung des intraokularen Drucks beruht dagegen beim Engwinkelglaukom auf einem engen Kammerwinkel, aus dem ein erschwelter Abfluss des Kammerwassers resultiert. Kommt es zu einer vollständigen Verlegung der Abflusswege, entwickelt sich ein akutes Winkelblockglaukom mit Drücken von 60-80 mm Hg, die sich in Kopfschmerzen, Übelkeit und evtl. Erbrechen niederschlagen (akuter Glaukomanfall). Aufgrund eines Ödems des Hornhautepithels sowie der Mangel durchblutung der Netzhaut infolge des stark erhöhten Augeninnendrucks, ist das Sehvermögen erheblich herabgesetzt. Beim chronischen Engwinkelglaukom sind die Abflusswege nur teilweise verlegt, die Drücke schwanken im Tagesverlauf deutlich und anfallsartige Drucksteigerungen sind jederzeit möglich [Thews et al. 1991].

Das Glaukom stellt, nach dem Diabetes mellitus, die zweithäufigste Ursache der Erblindung in den industrialisierten Ländern dar, von der etwa 2 % der Bevölkerung über 40 Jahre betroffen sind. Da vor allem beim Weitwinkelglaukom zu Beginn der Erkrankung subjektive Symptome selten vorkommen, wird das Glaukom erst dann erkannt, wenn bereits erhebliche Gesichtsfeldausfälle aufgetreten sind. Die Prognose hängt damit entscheidend von der Früherkennung und einer rechtzeitig eingeleiteten Therapie ab. Ohne Behandlung und oft auch trotz Behandlung kommt es sonst zum fortschreitenden Untergang von Sehnervfasern [Quigley 1987] und als Folge zu Gesichtsfeldausfällen sowie Störungen des Kontrast- und Farbsehens.

2.2.1.1 Therapie des Glaukoms

Das Ziel einer effektiven Glaukomtherapie ist die Senkung des Augeninnendrucks, die medikamentös durch topisch applizierbare Arzneistoffe erreicht werden kann. Diese Arzneistoffe können nach ihrer pharmakologischen Wirkung in folgende Gruppen eingeteilt werden [Rote Liste 2004]:

1. Parasympathomimetika (z.B. Pilocarpin, Carbachol)
2. Betarezeptorenblocker (β -Blocker) (z.B. Timolol, Befunolol, Pindolol)
3. Carboanhydrase-Hemmer (z.B. Dorzolamid, Brinzolamid)
4. α_2 -Agonisten (z.B. Apraclonidin, Brimonidin)
5. Prostaglandinanaloga (z.B. Latanoprost, Travoprost)

Das, in dieser Arbeit verwendete, Pilocarpin ist das Hauptalkaloid der Blätter der Rutacee *Pilocarpus jaborandus* (Jaborandiblätter), die bis zu 2 % Arzneistoff enthalten [Auterhoff et al. 1994]. Es wird fast ausschließlich als Miotikum in der Augenheilkunde bei der Therapie des Glaukoms eingesetzt [Mutschler 1996]. Die Strukturformeln der verwendeten Pilocarpin-Base und des Pilocarpin-HCl sind in Abbildung 2.4 dargestellt.

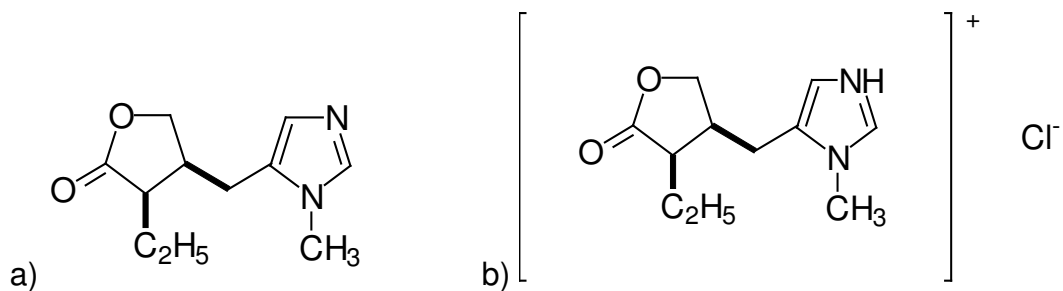


Abbildung 2.4: Strukturformeln von a) Pilocarpin-Base b) Pilocarpin-HCl.

Pilocarpin löst als direktes Parasympathomimetikum bei lokaler Anwendung über muscarinische Rezeptoren eine Dauerkontraktion des M. sphincter pupillae und des ringförmigen M. ciliaris aus. Dadurch kommt es einerseits zu einer Verengung der Pupille, andererseits werden die Abflusswege des Kammerwassers erweitert und so der intraokulare Druck für 6-12 h gesenkt. Aus diesem Grund ist Pilocarpin beim Engwinkelglaukom indiziert, wobei durch die Kontraktion des Ziliarmuskels das Auge auf den Nahpunkt akkommodiert wird, was zu einer vorübergehenden Kurzsichtigkeit führt [Mutschler 1996].

Nachteilig an einer Therapie mit Pilocarpin, das in wässrigen oder öligen Lösungen als Hydrochlorid oder Base eingesetzt wird (0,5-3,0 %), sind die erforderliche häufige Applikation (3mal täglich und zur Nacht) sowie die unerwünschten Nebenwirkungen [Rote Liste 2004].

2.2.2 Keratokonjunktivitis sicca

Das trockene Auge, die sogenannte Keratokonjunktivitis sicca, ist eine häufige Erkrankung des Auges, die in jedem Alter, bevorzugt aber bei Frauen mittleren Alters, auftritt. Der präcorneale Tränenfilm (Abbildung 2.5) besteht aus drei Schichten, einer äußeren Lipidschicht, einer mittleren wässrigen Schicht und einer inneren Mucinschicht [Messmer 1998].

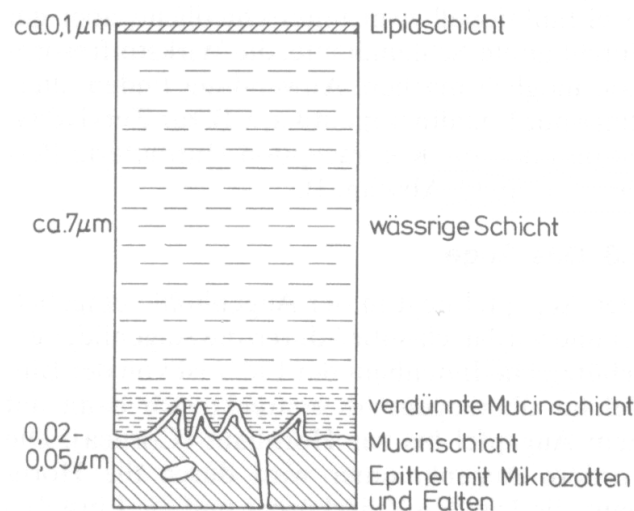


Abbildung 2.5: Schematischer Aufbau des Tränenfilms [Keller 1981].

Die Lipidschicht wird vom Sekret der Meibom-Drüsen der Augenlider sowie durch Talgdrüsen des Auges gebildet und verzögert die Verdunstung der wässrigen Schicht des Tränenfilms, wobei die vertikale Stabilität des Films unterstützt wird. Die wässrige Schicht wird von der Haupttränendrüse sowie den Drüsen der Bindehaut sezerniert und macht den Hauptanteil der Tränenflüssigkeit aus (98 %). Die wässrige Komponente ist vor allem für die Sauerstoffzufuhr zum Epithel der Cornea verantwortlich und enthält zwei antibakterielle Substanzen (Lysozym und NLAf), weswegen ein trockenes Auge für Infektionen anfälliger ist. Die wässrige Phase sorgt zudem für eine glatte optische Oberfläche und schwemmt Fremdkörper ab. Das Mucin der inneren Schicht entsteht aus dem Sekret der Becherzellen der Bindehaut und sorgt für eine Hydrophilisierung der Epitheloberfläche, um so das Anhaften des wässrigen Tränenfilms zu gewährleisten [Messmer 1998].

Das trockene Auge wird häufig durch die Verminderung einer einzigen Komponente des Tränenfilms verursacht und kann klinisch in fünf Kategorien eingeteilt werden:

1. Verminderung der wässrigen Komponente
2. Verminderung der Mucinkomponente
3. Veränderungen der Lipidschicht
4. Lidveränderungen
5. Erkrankungen des Hornhautepithels

Die häufigste Ursache ist dabei die Verminderung der wässrigen Komponente, die durch Traumen oder Entzündungen der Tränendrüse, aber auch durch die Zerstörung der Tränendrüsen der Bindehaut hervorgerufen sein kann. Zudem kann ein trockenes Auge medikamentös bedingt sein [Messmer 1998].

Zur Quantifizierung der Tränenflüssigkeit wird der Schirmer-Test angewendet [Schirmer 1903]. Dabei wird das Auge oberflächlich betäubt und dem Patienten werden Filterpapierstreifen in das Unterlid jedes Auges gehängt. Die Filterstreifen verbleiben bei geschlossenen Augen für 5 min im Unterlid und saugen sich in dieser Zeit mit der vorhandenen Tränenflüssigkeit voll. Die Länge der vollgesogenen Strecke beträgt beim Gesunden mindestens 10 mm, Werte darunter weisen auf ein trockenes Auge hin und Werte unter 5 mm gelten als sicher pathologisch [Messmer 1998].

2.2.2.1 Therapie der Keratokonjunctivitis sicca

Die Therapie des trockenen Auges zielt in den meisten Fällen auf die Beseitigung der Symptome ab, wobei einer Behandlung der Ursache, wie z.B. durch eine antibiotische oder antiinflammatorische Therapie, Vorrang gewährt werden muss. Die häufigste therapeutische Maßnahme ist jedoch die Tränensubstitution mit wässrigen Lösungen viskoser Substanzen oder mit Hydrogelen. Dazu werden Cellulosederivate wie Hydroxypropylmethylcellulose, die Polyvinylderivate PVA und PVP sowie Polyacrylsäurederivate eingesetzt [Messmer 1998].

Bei postmenopausalen Patientinnen kann eine Keratokonjunctivitis sicca auch auf einem Estrogenmangel beruhen. Estrogene sind wichtig für die Integrität von Schleimhäuten, wie der Konjunktiva [Liotet et al. 1987]. Sator et al. (1998) vermuten, dass Estradiol die NO-Synthase stimuliert, dessen, durch das gebildete Stickstoffmonoxid hervorgerufener, vasodilatatorischer Effekt evtl. nicht nur auf Blutgefäße, sondern auch auf Tränenkanäle erweiternd wirkt. In einer vergleichenden Studie zeigten sich signifikante Verbesserungen der beobachteten Symptome bei Gabe von

topischem Estradiol (0,025 % (m/m) in öliger Lösung), im Vergleich zu Patientinnen, die nur mit Tränenersatzmitteln behandelt wurden.

Zubereitungen zur ophthalmologischen Anwendung von 17β -Estradiol (Abbildung 2.6), das in dieser Arbeit als Modellarzneistoff untersucht wird, werden als Fertigarzneimittel nicht angeboten [Rote Liste 2004], sondern müssen rezepturmäßig hergestellt werden [Fischer und Reimann 1999]. Das Neue Rezeptur-Formularium (NRF) empfiehlt eine Lösung von 0,025 % (m/m) Estradiol-Hemihydrat in Sesamöl, die 3-4mal täglich appliziert werden muss [Sator et al. 1998].

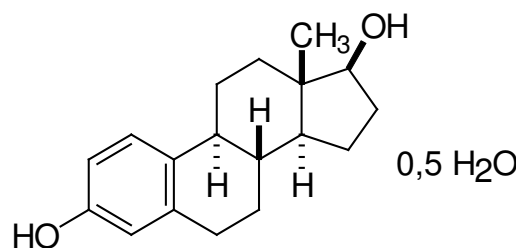


Abbildung 2.6: Strukturformel von 17β -Estradiol-Hemihydrat.

2.2.3 Entzündliche Erkrankungen des Auges

Der Einfluss schädlicher Noxen ruft im Gefäßbindegewebe eine Entzündungsreaktion hervor. Die Noxen können dabei unterschiedlicher Art sein, nämlich chemische oder physikalische Noxen, Traumen oder Infektionen mit Mikroorganismen oder Parasiten. Die fünf klassischen Symptome einer Entzündung sind

1. Rötung (Rubor)
2. Schwellung (Tumor)
3. Überwärmung (Calor)
4. Schmerz (Dolor)
5. gestörte Funktion (Functio laesa),

die als Folge der, sich aus der Gewebeschädigung ergebenden, Störung der Durchblutung in der terminalen Strombahn sowie des Austritts von Blutplasma (Exsudation) in den extravaskulären Raum, infolge einer Erhöhung der Kapillarpermeabilität, auftreten. Dies ist die Folge einer Freisetzung von Entzündungsmediatoren, wie z.B.

Prostaglandine und Leukotriene, aus dem geschädigten Gebiet, die eine Hyperämie erzeugen [Thews et al. 1991].

Auch am Auge zeigen sich die klassischen Entzündungszeichen. Entzündungen besitzen, da sie eine Abwehrreaktion des Körpers gegen Noxen darstellen, lebenserhaltende Funktionen, können aber andererseits auch zur bleibenden Gewebeschädigung oder zu Fehlfunktionen führen. Am Auge können verschiedenste Regionen betroffen sein, wie die Lider (Kontaktdermatitis), die Bindehaut (allergische Konjunktivitis), die Cornea (Keratitis), die Uvea (Iritis, Uveitis), die Netzhaut (retinale Vaskulitis), die Sclera (Scleritis) oder der Sehnerv (Neuritis) [Vogel und Berke 1998].

2.2.3.1 Therapie entzündlicher Erkrankungen des Auges

Da das Auge ein hoch empfindliches Organ ist und bei schweren Verläufen der Entzündung das Risiko bleibender, bis zur Erblindung führender, Augenschäden gegeben ist, ist eine medikamentöse Therapie angezeigt. Diese sollte, wenn möglich, die Ursache der Entzündung behandeln, ansonsten muss die Unterdrückung der Entzündungsreaktion erfolgen.

Antientzündliche Stoffe (Antiphlogistika) werden in zwei Klassen unterteilt, die nichtsteroidalen Antiphlogistika (Diclofenac, Indometacin) und die Glucocorticoide (Hydrocortison, Prednisolon, Dexamethason). Aufgrund ihrer höheren Wirkpotenz besitzen die Glucocorticoide bei der Behandlung schwerer Entzündungen eine größere Bedeutung. Die Wirkung der Glucocorticoide bei Entzündungsprozessen liegt in der Hemmung der Abwehrmechanismen. Diese beinhalten den Leukozytenaustritt aus dem Gefäßsystem, die Leukozytenphagozytose und teilweise auch die Antikörperbildung (Immunsuppression). Außerdem kommt es durch die Hemmung der Bildung der entzündungsfördernden Prostaglandine und Leukotriene sowie der Hemmung der Prostaglandinfreisetzung an der Zellmembran zu einer Unterdrückung von Gewebereizen [Thews et al. 1991].

Das, in dieser Arbeit verwendete, Hydrocortison (Abbildung 2.7) ist das physiologisch wichtigste, in der Nebennierenrinde gebildete, Glucocorticoid und wird auch als Cortisol bezeichnet. Mit einer Halbwertszeit von 1,7 h ist Hydrocortison ein kurzwirkender Vertreter der Glucocorticoide und zeigt, im Vergleich zu den synthetischen Derivaten, wie z.B. Prednisolon oder Dexamethason, eine sehr viel geringere antiphlogistische Wirksamkeit [Mutschler 1996].

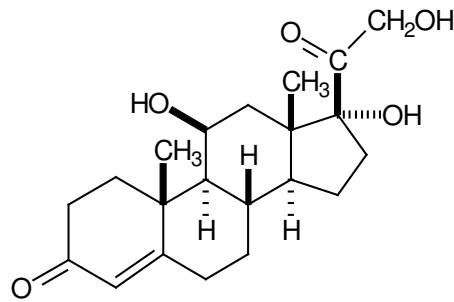


Abbildung 2.7: Strukturformel von Hydrocortison.

Als Fertigarzneimittel für die ophthalmologische Anwendung werden Augensalben auf Basis von Kohlenwasserstoffgrundlagen angeboten, die Hydrocortison in Form des Esters Hydrocortisonacetat in Konzentrationen von 0,5-2,5 % (m/m) enthalten. Nicht verestertes Hydrocortison wird in einer Konzentration von 1,5 % (m/V) als Ophthalmikum angeboten [Rote Liste 2004], bei dem es sich um hochviskose Suspensionstropfen handelt [Mannpharma 2004].

Hydrocortison ist nach Roter Liste (2004) bei allergischer Konjunctivitis, Iritis, Iridocyclitis, Uveitis, Chorioretinitis und zur Aufhellung von Hornhauttrübungen nach Keratitiden und Verätzungen oder Verbrennungen indiziert. Außerdem wird es bei postoperativen Reizzuständen angewandt. Bei längerer lokaler Anwendung von Glucocorticoiden kann es zu trophischen Hornhautschäden und Linsentrübungen sowie zur Erzeugung eines Cortisoninduzierten Glaukoms kommen [Rote Liste 2004].

2.3 Arzneiformen zur ophthalmologischen Applikation

Die Wirkung eines Arzneimittels ist, neben der pharmakologischen Wirkung des enthaltenen Arzneistoffs, in den meisten Fällen auch von der Arzneiform, d.h. der Formulierung des Arzneistoffs, abhängig. Diese beeinflusst die Verfügbarkeit der, überwiegend lokal am Auge, angewandten Wirkstoffe [Bauer et al. 2002].

2.3.1 Arzneibuchmonographie

In der derzeit gültigen Fassung des Europäischen Arzneibuchs [Ph. Eur. 4. Ausgabe, 4. Nachtrag 2003] sind in der Darreichungsmonographie „Zubereitungen zur Anwendung am Auge - Ophthalmica“ die untenstehenden Darreichungsformen zu finden:

1. Augentropfen
2. Augenbäder
3. Pulver für Augentropfen und Pulver für Augenbäder
4. Halbfeste Zubereitungen zur Anwendung am Auge
5. Augeninserte

Augentropfen sind sterile, wässrige oder ölige Lösungen oder Suspensionen eines oder mehrerer Wirkstoffe zur tropfenweisen Anwendung am Auge. Hilfsstoffzusätze zur Einstellung von Tonizität, Viskosität und pH sowie zur Stabilisierung des Arzneimittels sind dabei erlaubt, ebenso Stoffe, die die Löslichkeit des Wirkstoffs erhöhen oder die Zubereitung haltbar machen. Augentropfen in Form von Lösungen müssen klar sein, während Suspensionsaugentropfen ein, leicht zu dispergierendes, Sediment zeigen dürfen.

Halbfeste Zubereitungen sind sterile Salben, Cremes oder Gele zur Anwendung auf der Bindehaut. Die Wirkstoffe liegen wiederum gelöst oder dispergiert vor, wobei die Homogenität der Zubereitung gewährleistet sein muss.

Augeninserte sind sterile, feste oder halbfeste Zubereitungen, die in den Bindehautsack eingebracht werden und im Allgemeinen ein Wirkstoffreservoir und ein, die Wirkstofffreisetzung kontrollierendes, Element enthalten.

2.3.2 Galenische Aspekte bei Augenarzneimitteln

In den häufigsten Fällen werden Augentropfen in Form wässriger Lösungen eingesetzt. Aus diesen Formulierungen ist der Arzneistoff in der Regel am schnellsten verfügbar und die Akzeptanz beim Patienten ist bei Anwendung wässriger Lösungen höher als bei der Applikation ölicher Lösungen bzw. von Augensalben. Bei letztgenannten Formulierungen ist mit einer Sichtbehinderung zu rechnen, wodurch die Compliance des Patienten negativ beeinflusst wird. Aus diesem Grund werden ölige Lösungen und Augensalben vorzugsweise zur Nacht angewendet.

Wässrige Lösungen haben jedoch den Nachteil, dass sie nur wenige Minuten im Bindehautsack verbleiben und danach stark verdünnt über den Tränensack ausgeschwemmt werden [Honegger und Werry 1990]. Entsprechend schnell muss ein Arzneistoff in das Gewebe eindringen, um seine Wirkung zu erzielen. Ein weiteres Problem bei der Instillation von Augentropfen ist die Überladung der Tränenflüssigkeit des Auges, die ein Volumen von 7-10 µl besitzt, während ein applizierter Tropfen ein Vo-

lumen von etwa 50 µl einnimmt. Auch durch dieses Missverhältnis wird der größte Teil der Zubereitung schnell abfließen [Bauer et al. 2002].

Durch die Verwendung viskoser Augentropfen kann der Vorgang der Ausschwemmung verlangsamt werden, sodass es zur Erhöhung der Kontaktzeit der Zubereitung mit dem Auge und in Folge zu einer Wirkungsverlängerung kommt. Bei den viskositäts erhöhenden Substanzen handelt es sich meist um Celluloseether, Povidon oder Polyvinylalkohol, wobei eine Viskosität der Augentropfen von 10-25 mPas angestrebt werden sollte, um Reizungen zu vermeiden. Eine höhere Viskosität der Lösung wird ebenfalls bei Applikation ölig er Augentropfen erzielt, die als Grundlage häufig Rizinusöl enthalten.

Eine weitere Wirkungsintensivierung erfolgt bei der Anwendung von Augensalben, die eine lange Verweildauer besitzen und als Depotarzneiformen anzusehen sind [Lippold und Steinke 1990]. Die Augensalben besitzen hauptsächlich lipophile, kohlenwasserstoffhaltige Grundlagen oder stellen W/O-Emulsionssalben dar. Sie sind, abgesehen von der Sehbehinderung, gut verträglich und zeigen eine geringere systemische Absorption als Folge einer reduzierten Ableitung der Zubereitung in den Tränenkanal [Skinner 1990]. Hydrophile Augengele enthalten zumeist Polyacrylate als Gelbildner und kombinieren die Eigenschaften von Augentropfen und Augensalben. Die Freisetzung des Wirkstoffs erfolgt sehr viel schneller als aus Augensalben [Schoenwald et al. 1978], die Augengele zeigen dabei eine, den konventionellen Fettgrundlagen vergleichbare, Verträglichkeit [Bottari et al. 1978].

Eine verlängerte Wirkung des Arzneistoffs kann auch durch die Verwendung von wässrigen Suspensionen erreicht werden [Hui und Robinson 1986], wobei die ungelösten Partikel im Bindehautsack ein Depot darstellen [Lippold 1976]. Zur Vermeidung von Reizerscheinungen sollte die Partikelgröße kleiner als 20 µm sein. Dabei muss aber beachtet werden, dass Partikel, die kleiner als 3 µm sind, zu schnell über die Tränenkanäle ausgeschwemmt werden [Bauer et al. 2002].

2.3.3 Spezielle Drug Delivery Systeme zur ophthalmologischen Anwendung

Im Hinblick auf eine gesteuerte Freisetzung von Arzneistoffen mit einer erhöhten Bioverfügbarkeit sind in der Vergangenheit zahlreiche Drug Delivery Systeme, d.h. Formulierungen mit einer kontrollierten Freisetzung, entwickelt worden, von denen hier lediglich einige Beispiele genannt werden sollen.

Augeninserte aus, mit Pilocarpin imprägnierten, PVA-Scheiben sind bereits 1966 von Yakovlev und Lenkevich beschrieben worden. In der Zwischenzeit sind eine ganze Anzahl löslicher und unlöslicher Polymere synthetischer und natürlicher Herkunft untersucht worden, wobei die Materialien oder Applikationsformen bisher nicht zu zufriedenstellenden Ergebnissen geführt haben. Eine nahezu konstante Freigabe lässt sich jedoch durch ein membrankontrolliertes Freigabesystem erzielen. Ein System dieser Art stellt das, zeitweilig auf dem Markt befindliche, Ocusert[®] dar, das über sieben Tage 20 bzw. 40 µg/h Pilocarpin nach einer Kinetik nullter Ordnung freigibt [Keipert 1998].

Als flüssige Drug Delivery Systeme zur ophthalmologischen Anwendung sind auch kolloidale Träger in der Literatur beschrieben. Dazu gehören Liposomen [Niesmann 1992] und Mikroemulsionen [Gasco et al. 1989, Haße und Keipert 1997], wobei Liposomenformulierungen jedoch keine überzeugende Überlegenheit gegenüber etablierten Formulierungen zeigen [Keipert 1998].

Eine Verzögerung der Pilocarpinfreisetzung aus Polymernanopartikeln wird von Zimmer und Kreuter (1995) beschrieben. Als Materialien der Polymermatrix sind dabei u.a. Polycyanoacrylate sowie Albumin angegeben. Zimmer et al. (1994) beschreiben eine verzögerte Permeation von Hydrocortison aus Albuminnanopartikeln durch isolierte porcine Cornea. Pilocarpin ist von Vandervoort und Ludwig (1999) auch in Nanopartikel aus Gelatine inkorporiert worden.

Für Arzneistoffe, die für eine ophthalmologische Anwendung indiziert sind, werden außerdem feste Lipidnanopartikel entwickelt. So wird von Gasco et al. (1992) sowie Cavalli et al. (1992) Timolol in Lipidnanopartikel inkorporiert. Dabei wird der hydrophile Arzneistoff als lipophiles Ionenpaar eingesetzt, in Analogie zu lipophilen Komplexen von Pilocarpin bzw. Tobramycin [Cavalli et al. 1995, 2002]. Auf feste Lipidnanopartikel als kolloidale Trägersysteme wird in Abschnitt 2.4 näher eingegangen.

Ein weiteres kolloidales System stellen inverse Mizellen dar, die nach Kontakt mit Wasser in eine lamellare Mesophase transformieren [Hamann 1990, Papantoniou und Müller-Goymann 1995a]. Durch Hydratation der polaren Bereiche des Lecithins, das in öliger Lösung inverse Mizellen bildet, kommt es zu einer Vergrößerung des Querschnitts der hydrophilen Kopfgruppe, sodass der Packungsparameter des Amphiphils auf Werte um eins erniedrigt wird (Abbildung 2.8). Dieser Wert entspricht zylindrischen Molekülen, bei denen die Ausbildung von Lamellarphasen bevorzugt ist.

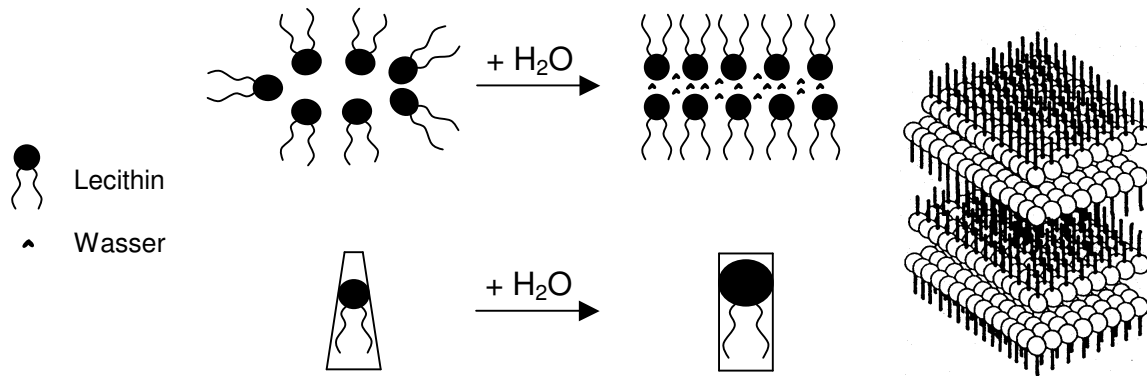


Abbildung 2.8: Schematische Darstellung der Transformation lecithinhaltiger inverser Mizellen zur Lamellarphase [Friedrich 2000].

Die Transformation einer invers mizellaren Lösung in ein halbfestes System aus lamellaren Flüssigkristallen kann auch applikationsinduziert stattfinden, wenn am Applikationsort Wasser zur Verfügung steht [Schneeweis und Müller-Goymann 1997]. Die Bildung einer Lamellarphase hat dabei eine verzögerte Freisetzung inkorporierter Wirkstoffe zur Folge, was durch verschiedene Arbeiten belegt ist. So beobachteten Müller-Goymann und Hamann (1993) eine retardierte Freisetzung von Fenoprofen aus einem System von Lecithin, Isopropylmyristat und Wasser. Wilisch (1994) beschreibt eine Verringerung des Permeationskoeffizienten von Fenoprofen bei Untersuchungen mit exzidiertem Stratum corneum. Dabei wird ein invers hexagonales System mit einer invers mizellaren Lösung verglichen. Pilocarpin-HCl permeiert, im Vergleich zu wässrigen Lösungen, aus einer lamellaren Mesophase verlangsamt durch exzidierte porcine Cornea [Papantoniou 1995]. Auch Tegtmeier et al. (2001) benutzten das System zur Untersuchung der Pilocarpin-Permeation durch organotypische Cornea-Konstrukte. Bei Vergleich einer, in eine Lamellarphase transformierenden, invers mizellaren Lösung mit einem öligen Fertigarzneimittel stellte Reichl (2003) einen 20fach niedrigeren Permeationskoeffizienten sowohl für exzidierte porcine Cornea als auch für ein porcines Cornea-Konstrukt fest.

Da durch eine Applikation am Auge eine invers mizellare Lösung durch den vorhandenen Tränenfilm stets in eine Mesophase transformiert, ist dieses ölige System entsprechend ein geeignetes ophthalmologisches Drug Delivery System. Dabei darf nicht unerwähnt bleiben, dass es durch ölige Augentropfen zu einer Sichtbehinderung und Schlierensehen kommt, was sich durch die Bildung des lamellaren Flüssigkristalls noch ausgeprägter zeigen sollte.

2.4 Feste Lipidnanopartikel

2.4.1 Geschichte

Partikuläre Arzneistoffträger, wie Liposomen, Emulsionen zur parenteralen Anwendung, Mikro- und Nanopartikel befinden sich seit einigen Jahren im Focus der pharmazeutisch-technologischen Forschung, wobei die beiden erstgenannten bereits erfolgreich ihren Weg in den Markt gefunden haben [Schmitt 1998, Diederichs und Müller 1994]. Die, auf Polymernano- oder mikropartikeln basierten, Produkte sind allerdings rar, obwohl schon sehr lange auf diesem Gebiet geforscht wird [Müller et al. 2000]. Der Grund hierfür liegt darin, dass dieses Material zwei existenzielle Nachteile besitzt: Zum einen sind die verwendeten Materialien, zumindest als Partikel im Nanometerbereich, zytotoxisch [Smith und Hunneyball 1986], zum anderen sind die Möglichkeiten einer effektiven Produktion im großen Maßstab nicht gegeben [Müller et al. 2000].

Als Alternative zu den polymerbasierten Nanopartikeln stellten u.a. die Arbeitsgruppen um Gasco [Cavalli et al. 1992, 1993, Gasco et al. 1992, Gasco 1993], Müller [Schwarz et al. 1994, Müller et al. 1995, Müller und Lucks 1996] und Westesen [Siekman und Westesen 1992, Sjöström und Bergenstahl 1992, Sjöström et al. 1993, Westesen et al. 1993, Westesen und Siekman 1994] in den 90er Jahren feste Lipidnanopartikel vor, die als Liposphären, SLN (vom Englischen: solid lipid nanoparticles) oder SLP (vom Englischen: solid lipid particles) bezeichnet werden.

Feste Lipidnanopartikel sind Partikel aus, bei Raumtemperatur, festen Lipiden mit einem mittleren Partikeldurchmesser von 50-1000 nm. Eingesetzt werden dabei vorwiegend physiologische Lipide oder Lipide aus physiologischen Komponenten [Müller 1998b], die eine gute in vivo Abbaubarkeit gewährleisten [Müller et al. 1996]. In der Regel handelt es sich um Triglyceride körpereigener Fettsäuren. Zur Stabilisierung der Lipidteilchen in einem wässrigen System werden zumeist ein oder mehrere O/W-Emulgatoren verwendet [Müller und Lucks 1996], es ist aber auch eine Stabilisierung mit Polymeremulgatoren möglich.

2.4.2 Herstellung

Zur Herstellung fester Lipidnanopartikel können verschiedene Verfahren angewendet werden, von denen hier die wichtigsten genannt sind:

2.4.2.1 Mikroemulsionstechnik

Mikroemulsionen, die aus Lipid, Tensid und Wasser in einem bestimmten Verhältnis bestehen, sind transparente Systeme, die eher als eine kritische Lösung denn als Emulsion aufzufassen sind [Müller 1998a]. Die Zugabe von Mikroemulsionen zu Wasser führt zur Präzipitation des Lipids und als Folge zur Bildung kleiner Partikel [Gasco 1993]. Die Lipide müssen dabei zur Herstellung der Mikroemulsion geschmolzen sein, d.h. es werden warme Mikroemulsionen hergestellt, die in ein kaltes wässriges Medium unter Rühren dispergiert werden. Die Bildung kleiner Partikel ist dabei auf die Präzipitation und nicht auf mechanische Beanspruchung durch das Rühren zurückzuführen [Gasco 1997]. Der Nachteil dieser Technologie liegt in der Verwendung kritischer Substanzen zur Herstellung der Mikroemulsion, wie z.B. Butanol. Zudem beinhaltet das Verfahren eine Verdünnung der Lipide bei der Dispergierung in Wasser, was geringe Lipidkonzentrationen im Endprodukt zur Folge hat.

2.4.2.2 Solvent Injection

Eine weitere Methode beschreiben Schubert und Müller-Goymann (2003). Die Lipide werden dabei in, mit Wasser mischbaren, Lösemitteln, wie Ethanol oder Isopropanol, gelöst und diese Lösung wird dann schnell in Wasser oder eine wässrige Emulgatorlösung eingespritzt. Das Ausnutzen einer Mischungslücke führt auch hier zu Lipidpräzipitaten im Nanometerbereich, die durch das Tensid sofort stabilisiert werden. Das Verfahren ist sehr einfach durchzuführen und vielseitig anwendbar, wobei die Verwendung organischer Lösemittel und die zu erzielenden Lipidkonzentrationen von unter 1 % (m/m) kritisch betrachtet werden müssen.

2.4.2.3 Rotor-Stator-Homogenisation und Ultraschall

Ein frühes Verfahren zur Herstellung von Lipidpartikeln ist die Homogenisation der Dispersionen mit einem Rotor-Stator-Homogenisator unter Verwendung hoher Scherkräfte. Auch die Behandlung der Dispersionen mit Ultraschall wird beschrieben [Speiser 1990]. Beide Methoden sind wiederum relativ einfach durchführbar und vielseitig anwendbar. Es resultieren jedoch breite Partikelgrößenverteilungen mit Partikeln im Mikrometerbereich. Nachteilig ist außerdem, dass bei einer Ultraschallbehandlung die Gefahr besteht, das Gut mit Metallabrieb zu kontaminieren [Mehnert und Mäder

2001] und dass bei beiden Methoden relativ hohe Tensidkonzentrationen zur Erzielung von Nanopartikeln nötig sind [Müller 1998b].

Domb (1993) stellte Liposphären im Mikrometerbereich aus festen Lipiden her, die mit Phospholipidlayern überzogen sind. Das geschmolzene Lipid wird in einer Phospholipiddispersion unter Rühren oder Ultraschallbehandlung dispergiert, wobei Lipiddispersionen, die allein mit Phospholipiden stabilisiert werden, zur Bildung halbfester, gelartiger Systeme neigen [Westesen und Siekmann 1997].

2.4.2.4 Hochdruckhomogenisation

Das gängigste Verfahren zur Herstellung fester Lipidnanopartikel ist die Hochdruckhomogenisation unter Verwendung eines Kolben-Spalt-Homogenisators. Die Hochdruckhomogenisation ist ein Verfahren, bei dem die Produktion der Nanosuspensionen auch in großem Umfang möglich ist und ein Scaling-Up von Labor- auf Industriegeräte leicht möglich ist [Müller und Lucks 1996]. Auf das eigentliche Verfahren der Hochdruckhomogenisation wird in Abschnitt 2.5 eingegangen.

Mit Hochdruckhomogenisatoren können feste Lipidnanopartikel auf drei Wegen hergestellt werden (Abbildung 2.9). Bei der sogenannten Heißhomogenisation wird das Lipid geschmolzen, Wirkstoffe werden gelöst oder dispergiert und das geschmolzene Lipid wird dann mit einem Rotor-Stator-Homogenisator (Ultra-Turrax) in einer warmen Lösung eines oder mehrerer Tenside emulgiert. Anschließend wird diese Vor-emulsion bei Temperaturen, die weit über dem Schmelzpunkt des Lipids liegen, hochdruckhomogenisiert, wobei die Anzahl der Passagen (Zyklen) und der Druck variable Prozessparameter darstellen. Die entstehende feine Emulsion enthält Tröpfchen im Nanometer-Bereich, die sich unter Kühlung verfestigen [Müller und Lucks 1996]. Eine Rekristallisation nach der Homogenisation kann dabei nicht in allen Fällen sicher gestellt werden, denn bei der Verfestigung bei Raumtemperatur kann es zur Bildung amorpher, unterkühlter Schmelzen kommen. Dies kann vermieden werden, indem die Dispersionen tief unter die Kristallisationstemperatur der Triglyceride gekühlt werden [Westesen und Bunjes 1995].

Im Gegensatz zur Heißhomogenisation wird bei der Kalthomogenisation das geschmolzene Lipid (mit oder ohne inkorporierten Wirkstoff) zunächst wieder verfestigt und zu einem pulverförmigen Gut vermahlen. Dazu kann flüssiger Stickstoff verwendet werden, der, durch seine tiefe Temperatur, das Material sehr spröde und damit gut zerkleinerbar macht. Die auf diese Weise hergestellten Lipidpartikel werden in

einer kalten Lösung suspendiert und diese grobe Vordispersion der Hochdruckhomogenisation zugeführt. Diese wird unter Kühlung des Homogenisators oder bei Raumtemperatur durchgeführt, sodass die Partikel im festen Zustand verbleiben. Die im Homogenisator auftretenden Kavitationskräfte (vgl. Abschnitt 2.5) sollen ausreichen, um Mikropartikel in Nanopartikel zu zerkleinern [Müller 1998b], was eine diskussionwürdige Aussage ist. Eine Kalthomogenisation bietet im Vergleich zu der Homogenisation in der Wärme den Vorteil, dass hitzeempfindliche Güter formulierbar sind und die Diffusion hydrophiler Substanzen aus der Lipidphase in das wässrige Medium minimiert wird.

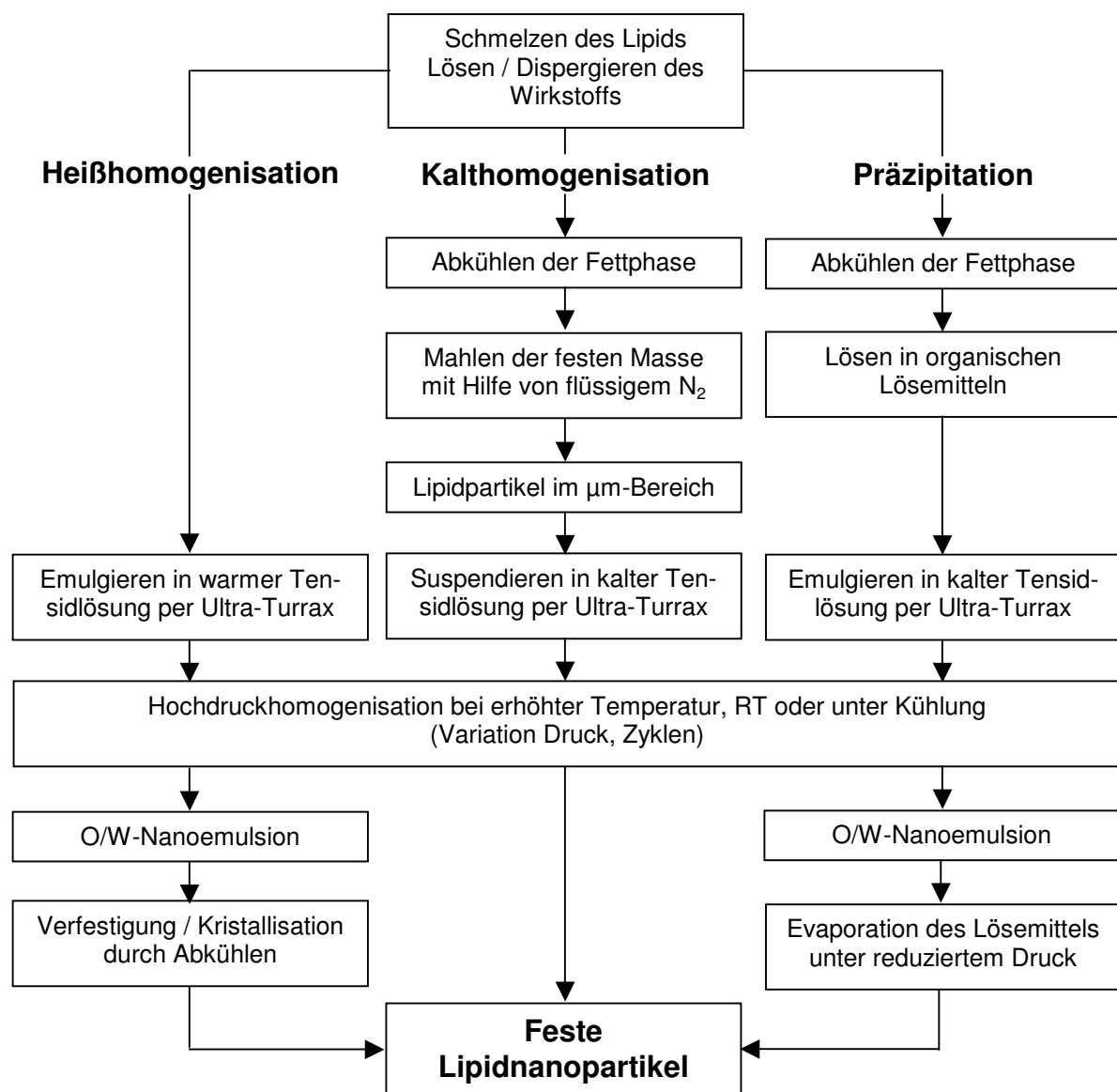


Abbildung 2.9: Schematische Darstellung der Herstellung fester Lipidnanopartikel per Hochdruckhomogenisation.

Die Kombination aus Präzipitation aus Lösemitteln und der Hochdruckhomogenisation wird von Siekmann und Westesen (1996) beschrieben (Abbildung 2.9). Das erstarrte (arzneistofffreie oder -haltige Lipid) wird in einem organischen Lösemittel (z.B. Chloroform oder Cyclohexan) gelöst und diese lipophile, organische Lösung dann in der Kälte per Ultra-Turrax in einer Tensidlösung emulgiert. Die Voremulsion wird anschließend hochdruckhomogenisiert und das Lösemittel aus der entstandenen O/W-Nanoemulsion unter reduziertem Druck abgezogen, währenddessen es zur Ausfällung der Lipide in Nanokristallen kommt. Die Verwendung organischer Lösemittel sowie die geringen, erzielbaren Lipidgehalte von 2,5 % (m/m) [Siekmann und Westesen 1996] sind bei diesem Verfahren kritisch zu bewerten.

2.4.3 Eigenschaften fester Lipidnanopartikel

Suspensionen fester Lipidnanopartikel sind aufgrund ihrer geringen Abmessungen prinzipiell für eine parenterale sowie ophthalmologische Applikation geeignet. Die dazu nötige Sterilisierbarkeit ist nach Mehnert et al. (1997) durch Autoklavierung oder Sterilisation mit Gammastrahlen gegeben, wobei es bei der Autoklavierung zu einer Partikelgrößenzunahme in gewissem Umfang kommt. Die Sterilisierbarkeit fester Lipidnanopartikel untersuchten auch Cavalli et al. (1997). Ob die Sterilisation mit gesättigtem, gespanntem Wasserdampf in jedem Fall bei Lipidnanopartikeln angewandt werden kann ist jedoch fraglich und von der Zusammensetzung des Systems abhängig. Trotzdem stellt die prinzipielle Autoklavierbarkeit einen Vorteil gegenüber Polymerpartikeln dar, deren Sterilisation nur durch Gammabestrahlung möglich ist.

Von Cavalli et al. (1997), Müller et al. (1997a) sowie Schwarz und Mehnert (1997) wird auch die Möglichkeit beschrieben, Nanosuspensionen unter Verwendung von Kryoprotektoren, wie Glucose und Trehalose, gefrierzutrocknen, um so die physikalische Langzeitstabilität der Systeme zu gewährleisten. Dabei kann es bei der Rekonstitution aber zu verstärkter Agglomeratbildung kommen [Müller et al. 1997a].

Müller et al. (1997a, 1997b) untersuchten ebenfalls die Zytotoxizität fester Lipidnanopartikel auf Granulozyten. Diese ist, im Vergleich zu Polycyanoacrylatpartikeln, sehr gering und im Wesentlichen auf das enthaltende Tensid zurückzuführen. Müller et al. (1997a) berichten von einer Viabilität der Granulozyten nach der Behandlung mit poloxamerstabilisierten Nanopartikeln von über 80 %.

Untersuchungen zur Kristallinität fester Lipidnanopartikel sind in zahlreichen Arbeiten durchgeführt worden. Insbesondere die Arbeitsgruppe um Westesen hat auf diesem

Gebiet zahlreiche Arbeiten veröffentlicht [Siekmann und Westesen 1994c, Bunjes et al. 1996, 2000, 2003, Unruh et al. 2001]. In der Regel kristallisieren die Triglyceride in einer stabilen, triklinen β -Modifikation, was aufgrund der hohen Ordnung des Kristallgitters die Inkorporation von Arzneistoffen erschwert. Aus diesem Grund sind Versuche beschrieben, in die feste Matrix der Triglyceride flüssige Komponenten zu inkorporieren. Die flüssigen Triglyceride stören das Kristallgitter der festen, langkettigen Triglyceride, wobei sich die Matrix immer noch im festen Zustand befindet [Jenning et al. 2000c].

Dispersionen aus festen Lipidnanopartikeln sind als Arzneiform nicht nur für eine parenterale und ophthalmologische Applikation geeignet, auch eine kosmetische Anwendung, d.h. eine topische Applikation auf die Haut, wird vorgeschlagen [Dingler et al. 1999]. Zu diesem Zweck können auch halbfeste Systeme mit Nanopartikeln hergestellt werden, die Lipidgehalte bis zu 35 % (m/m) enthalten und in denen nach der Herstellung immer noch diskrete Partikel zu identifizieren sind [Lippacher et al. 2001]. Jennings et al. (2000a) untersuchten den Einfluss von Lipidnanopartikeln auf die Arzneistoffpenetration durch die Haut, Wissing und Müller (2001) verwendeten Lipidnanopartikel als Träger für UV-Blocker.

2.4.4 Beladung fester Lipidnanopartikel mit Arzneistoffen

Die Beladung der Partikel mit Arzneistoffen ist ein, in der Literatur viel diskutierter, Aspekt dieser kolloidalen Trägersysteme. Einen Überblick über inkorporierte Arzneistoffe bieten die Übersichtsarbeiten von Müller et al. (2000) sowie Mehnert und Mäder (2001). Über die Lokalisierung und den physikalischen Zustand der Arzneistoffmoleküle gibt es nur wenige Arbeiten [Mehnert und Mäder 2001].

Die Inkorporation der Arzneistoffe hängt unter anderem von folgenden Faktoren ab [Müller et al. 2000]:

1. Löslichkeit des Arzneistoffs in der Lipidschmelze
2. Mischbarkeit von Arzneistoffschmelze und Lipidschmelze
3. Chemische und physikalische Struktur der festen Lipidmatrix
4. Polymorpher Zustand des Lipids

Daraus folgt, dass lipophile Arzneistoffe in Kombination mit einer, in ihrer Ordnung gestörten, Lipidmatrix zur Erzielung einer hohen Inkorporationsrate geeigneter erscheinen. Ein perfektes Kristallgitter, wie z.B. bei der β -Modifikation von monoacidischen Triglyceriden, führt nach Westesen et al. (1997) zur Verdrängung des Arzneistoffs bei der Kristallisation, während z.B. der Einsatz von Mono- und Diglyceriden die Arzneistofflöslichkeit in der Lipidmatrix aufgrund von Störstellen des Gitters erhöht [Mehnert et al. 1997].

Bezüglich der Arzneistofffreisetzung aus festen Lipidnanopartikeln kann in den meisten Fällen ein Initialeffekt beobachtet werden [zur Mühlen et al. 1998], wobei Prednisolon aus, per Kalthomogenisation hergestellten, Nanopartikeln langsamer freigesetzt wird als aus Systemen, die in der Wärme produziert sind [zur Mühlen und Mehnert 1998]. Während der Kalthomogenisation findet eine Gleichgewichtseinstellung der Arzneistoffkonzentration zwischen Lipid und wässriger Phase in geringerem Ausmaß statt. Zur Mühlen und Mehnert (1998) postulieren für die Heißhomogenisation eine Rückanlagerung des Arzneistoffs an die Nanopartikel während des Abkühlprozesses nach der eigentlichen Produktion. Dabei sinkt die Löslichkeit des Arzneistoffs in der wässrigen Phase, in die der Arzneistoff in der Wärme vermehrt diffundiert ist. Entsprechend würden arzneistoffbeladene Nanopartikel mit einer arzneistoffreichen Schale entstehen, die den, in der Schale lokalisierten, Stoff initial freisetzen. Höhere Temperaturen und höhere Emulgatorkonzentrationen, die den Arzneistoff solubilisieren könnten, würden den Anteil an initialer Dosis erhöhen. Diese Hypothese ist diskussionswürdig, da der Arzneistoff ebenso auskristallisieren und somit als Kristall in Koexistenz zu Nanopartikeln stehen könnte.

Auf der anderen Seite kann es zu einem arzneistoffreichen Kern der Nanopartikel kommen, wenn der Arzneistoff vor dem Lipid kristallisiert [Müller et al. 2000]. Dies kann der Fall sein, wenn ein Arzneistoff in Konzentrationen nahe der Sättigung inkorporiert wird. Ein Abkühlen der Dispersion führt dann zur Übersättigung und schließlich zur Kristallisation des Stoffs im geschmolzenen Lipid. Nach Kristallisation des Lipids bildet sich ein arzneistoffreicher Kern, um den sich anschließend noch reines Lipid verfestigt. Ob jedoch bei der Übersättigung der Lipide ein Austritt von kristallinem Arzneistoff vermieden wird, bleibt ebenfalls fraglich.

2.5 Hochdruckhomogenisation

Wie in Abschnitt 2.4.2.4 bereits angesprochen, ist die Hochdruckhomogenisation das am häufigsten angewandte Verfahren, um Lipidnanopartikel zu produzieren.

2.5.1 Prinzip

Das Prinzip der Hochdruckhomogenisation wurde bereits 1890 von Auguste Gaulin für Milchprodukte vorgestellt und das Grundprinzip trotz zahlreicher Modifikationen bis heute nicht verändert.

Ein Hochdruckhomogenisator besteht grundsätzlich aus einer Kolbenpumpe mit einem nachfolgenden Hochdruckventil. Die Hochdruckpumpe muss dabei genügend Druck aufbringen, um das Gut durch das Homogenisierventil zu drücken. Das Homogenisierventil (Abbildung 2.10) besteht aus einem festen Ventilsitz und einem variabel einstellbaren Ventil. Beide Komponenten bilden einen radialen, einstellbaren Spalt. Der Spalt und als Folge die Widerstände, die dort vorherrschen, beeinflussen den Homogenisierdruck. Ein weiteres Bauelement der Homogenisiereinheit ist ein sogenannter Impact Ring, der die Form des Auslasses bestimmt.

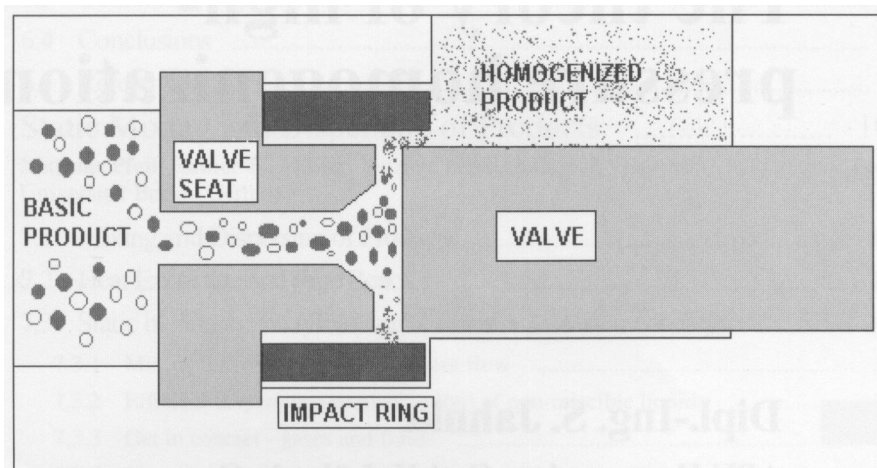


Abbildung 2.10: Schematische Darstellung des Homogenisierventils [Jahnke 2001].

Der, in dieser Arbeit verwendete, EmulsiFlex-C5 der Fa. Avestin ist ein komplett pneumatisch betriebener Kolben-Spalt-Homogenisator, d.h. sowohl der Betrieb der Kolbenpumpe als auch die Einstellung des Homogenisierventils erfolgen durch angelegte Pressluft mit einem Vordruck von 5-10 bar. Der Stempel ist bei dem Gerät jedoch nicht plan, sondern läuft konusförmig in den Ventilsitz hinein. Die produktfüh-

renden Bereiche eines Avestin EmulsiFlex-C160, der prinzipiell den gleichen Aufbau wie der EmulsiFlex-C5 besitzt, sind in Abbildung 2.11 dargestellt.

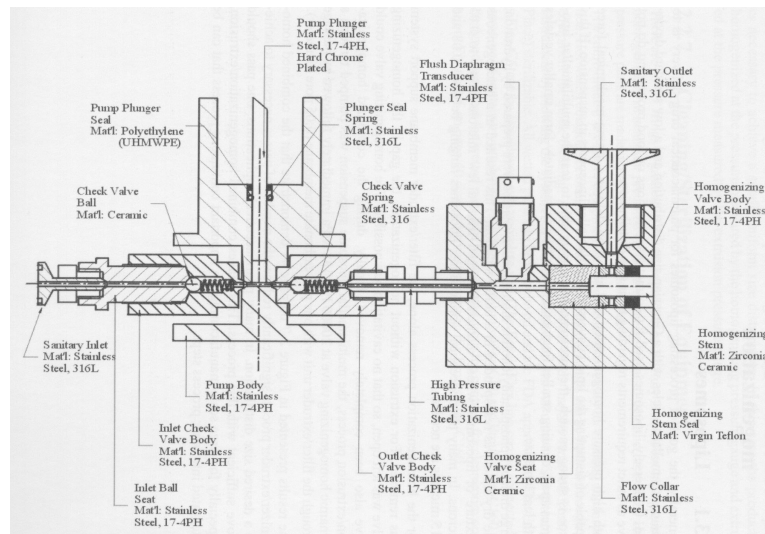


Abbildung 2.11: Schematische Darstellung der produktführenden Bereiche eines Avestin EmulsiFlex-C160 [Goodings 2001].

Ein weiteres Bauprinzip von Hochdruckhomogenisatoren sind die, in Microfluidizer der Fa. Microfluidics verwendeten, statischen Interaktionskammern (Abbildung 2.12). Diese führen das Gut in geometrisch speziell geformten Kanälen durch die Homogenisiereinheit, wobei zwischen der Z-Typ- und der Y-Typ-Interaktionskammer unterschieden wird. Durch die Pumpe wird das Produkt durch die Kammer gepresst, in deren Kanälen es auf hohe Geschwindigkeiten beschleunigt wird, sodass entsprechend hohe Scherkräfte auf das Gut einwirken [Bruno und McIlwrack 2001].

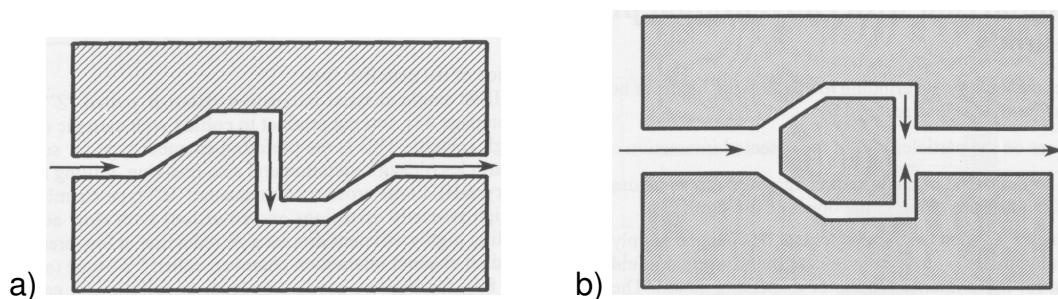


Abbildung 2.12: Schematische Darstellung der Interaktionskammern eines Microfluidizers a) Z-Typ b) Y-Typ [Bruno und McIlwrack 2001].

Aufgrund der ähnlichen Bauweise von Kolben-Spalt-Homogenisatoren verschiedener Größen und Fabrikate einerseits und von Microfluidizer verschiedener Leistung andererseits, stellt ein Scaling-Up vom Labor- auf den Produktionsmaßstab in der Regel kein Problem dar [Jenning et al. 2002]. Dabei können z.B. kontinuierlich arbeitende Hochdruckhomogenisatoren genutzt werden.

2.5.2 Auftretende Kräfte und Parameter der Hochdruckhomogenisation

Die im Homogenisierventil auftretenden Kräfte, die für die Zerteilung von z.B. Zellen, Partikeln, Agglomeraten und Tröpfchen verantwortlich sind, beinhalten Scherkräfte in laminarer und turbulenter Strömung, Prallkräfte, die beim direkten Aufprall des Produkts auf das Homogenisierventil auftreten, sowie Kavitationskräfte. Kavitation ist ein Hohlsog, der entsteht, wenn es zu einem örtlichen Druckabfall kommt. Im Homogenisierventil kommt es zu einer extremen Abnahme des statischen Drucks, der unter den Dampfdruck der kontinuierlichen Phase sinkt. Dadurch implodieren vorhandene Gasblasen und der resultierende Hohlsog führt zu einer Zerkleinerung mitgerissener Partikel [Jahnke 2001].

Bei der Hochdruckhomogenisation müssen, um eine effektive Zerkleinerung zu erzielen, bestimmte Prozessparameter berücksichtigt werden. Dazu gehört die Viskosität der dispersen Phase, die maßgeblichen Einfluss auf das Ergebnis hat und der Zerteilung der Phase entgegenwirkt, während die Viskosität der kontinuierlichen Phase nur einen geringen Einfluss besitzt. Des Weiteren beeinflusst die Emulgatorkonzentration und die Geschwindigkeit, mit der der Emulgator neu geschaffene Oberflächen besetzt, die Effektivität des Verfahrens, genauso wie die Qualität der Ausgangssuspension bezüglich der Größe der enthaltenen Partikel. Einen wesentlichen, wenn nicht den größten, Einfluss auf die Zerkleinerung besitzen der Homogenisierdruck und die Anzahl der Passagen, d.h. wie oft das Gut das Homogenisierventil passiert. Die Partikelgrößen streben in Abhängigkeit von der Passagenzahl einen Endwert an, ab dem keine weitere Erhöhung des Dispersitätsgrads mehr erzielt werden kann. Auch die Temperatur, bei der die Homogenisierung durchgeführt wird, hat einen großen Einfluss, denn sie bestimmt, ob die disperse Phase fest oder flüssig vorliegt und beeinflusst im flüssigen Zustand die Viskosität der dispersen Phase [Jahnke 2001].

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Arzneistoffe

Pilocarpin

Die direkten Parasympathomimetika Pilocarpin-Base (M_r 208,25) und Pilocarpin-hydrochlorid (M_r 244,72) werden von der Firma Dr. Mann Pharma (D-Berlin) zur Verfügung gestellt (Strukturformeln siehe Abbildung 2.4). Die Base, die in Arzneibuchqualität nach USP vorliegt, wird im Folgenden teilweise abgekürzt mit PB, das Hydrochlorid wird weiterhin mit Pilocarpin-HCl bzw. PHCl bezeichnet und besitzt Arzneibuchqualität Ph.Eur.

17 β -Estradiol

Das weibliche Sexualhormon 17 β -Estradiol wird von der Firma Jenapharm (D-Jena) in Arzneibuchqualität USP zur Verfügung gestellt (Strukturformel siehe Abbildung 2.6). Verwendung findet dabei das Hemihydrat des Arzneistoffs (M_r 281,45). Das Estrogen wird im Weiteren mit Estradiol oder EST bezeichnet, alle Konzentrations- und Gehaltsangaben beziehen sich jedoch auf das Hemihydrat.

Hydrocortison

Das Glucocorticoid Hydrocortison (M_r 362,47), im Folgenden teilweise durch HC abgekürzt, wird von der Firma Synopharm (D-Barsbüttel) in Arzneibuchqualität Ph.Eur.Ntr. 1999 bezogen (Strukturformel siehe Abbildung 2.7).

3.1.2 Rezepturgrundstoffe

Hartfette

Als Lipidmatrix für Lecithin-Hartfett-Gemische bzw. Lipidnanopartikel wird Softisan 100, im Folgenden auch abgekürzt mit S100, sowie Softisan 142 (S142) verwendet. Beide Softisan-Typen werden von der Firma Condea (D-Witten) zur Verfügung gestellt und sind Triglyceridgemische pflanzlichen Ursprungs. Sie unterscheiden sich in Ihrer Fettsäurezusammensetzung und in ihrem Schmelzpunkt. Die Kenn-

zahlen sowie die Fettsäurezusammensetzung der Hartfette laut Hersteller sind in Tabelle 3.1 gegenübergestellt.

Tabelle 3.1: Kennzahlen und Fettsäurezusammensetzung [%] der Hartfette.

	Softisan 100	Softisan 142
Verseifungszahl	238	224
Hydroxylzahl	10,6	12,4
Iodzahl	0,3	0,4
Säurezahl	0,11	0,11
Steigschmelzpunkt [°C]	34,6	43,6
C ₈	<0,1	0,1
C ₁₀	0,3	0,3
C ₁₂	54,4	33,8
C ₁₄	19,4	12,3
C ₁₆	12,5	25,5
C ₁₈	12,8	27,5
C _{18:1}	0,1	<0,1
C ₂₀	0,1	0,3
Monoglyceride	0,2	0
Diglyceride	12,1	12,0
Triglyceride	87,8	87,9

Lecithin

Als Coemulgator bzw. zum Zweck der Arzneistoffsolubilisierung wird Phospholipon 90G verwendet, das freundlicherweise von der Firma Nattermann Phospholipid (D-Köln) zur Verfügung gestellt wird. Das Phospholipid wird im Folgenden auch als P90G abgekürzt.

Phospholipon 90G ist ein hochgereinigtes Sojalecithin mit einem Mindestgehalt an Phosphatidylcholin von 90 % (m/m) und einem Anteil von Lysophosphatidylcholin von maximal 6 % (m/m). Abbildung 3.1 gibt die Strukturformel von Phosphatidylcholin (M_r ca. 800) wieder, aus Tabelle 3.2 ist das Fettsäurespektrum des Phospholipon 90G nach Angaben des Herstellers [Gareiß et al. 1994] zu entnehmen.

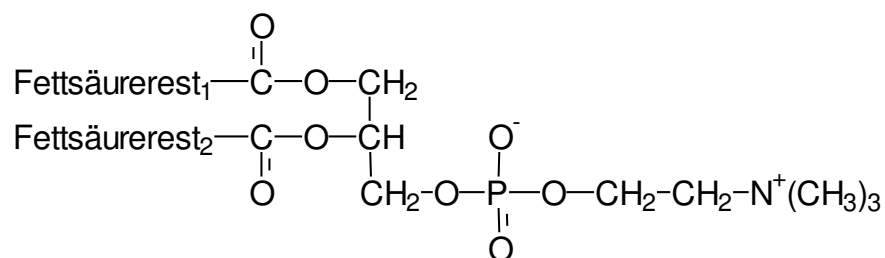


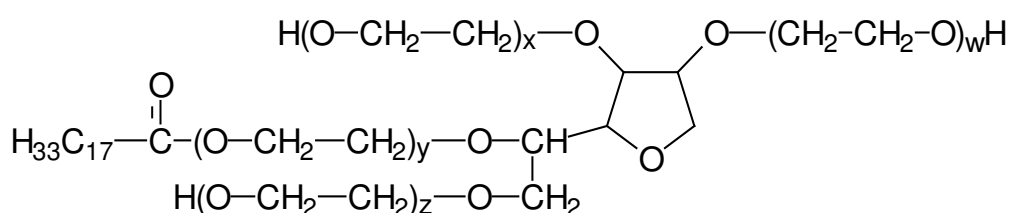
Abbildung 3.1: Strukturformel von Phosphatidylcholin.

Tabelle 3.2: Fettsäurespektrum [%] von Phosphatidylcholin aus der Sojabohne.

Fettsäure	Fettsäurerest ₁	Fettsäurerest ₂	Total
Palmitinsäure C ₁₆	24,0	1,7	12,9
Stearinsäure C ₁₈	7,9	1,0	4,4
Ölsäure C _{18:1}	10,9	10,0	10,5
Linolsäure C _{18:2}	52,4	80,6	66,5
Linolensäure C _{18:3}	4,7	6,7	5,7

Polysorbat 80

Polysorbat 80 (Syn. Tween 80), im Folgenden auch als PS80 bezeichnet, wird als Tensid für die Stabilisierung der Nanosuspensionen verwendet und von der Firma Caelo (D-Hilden) in Arzneibuchqualität Ph.Eur.Ntr. 1999 bezogen. Polysorbat 80 ist ein Polyoxyethylen-20-Sorbitanmonooleat, dessen HLB mit 15,0 angegeben wird und das vom Kaninchenauge irritationslos vertragen wird [Fiedler 1996]. Die Strukturformel ist in Abbildung 3.2 wiedergegeben.

Abbildung 3.2: Strukturformel von Polysorbat 80 ($w+x+y+z = 20$).

Poloxamer 188

Der nichtionogene Polymeremulgator Poloxamer 188 (Syn. Pluronic F68) wird ebenfalls in Stabilisierungsversuchen für Nanosuspensionen verwendet und von der Firma Synopharm (D-Barsbüttel) in Qualität nach DAC 1998 geliefert. Poloxamer 188 ist ein Polyoxyethylen-Polyoxypropylen-Polymer mit einem HLB von 29 [Bauer et al. 2002], das in 10 %iger Konzentration nicht hämolysierend wirkt [Fiedler 1996]. Abbildung 3.3 zeigt die Strukturformel des Emulgators.

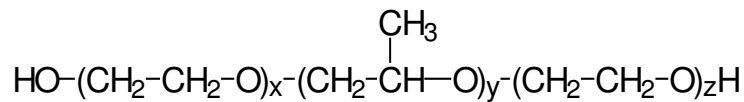


Abbildung 3.3: Strukturformel von Poloxamer 188 (x=75, y=30, z=75).

Polyacrylsäure

Zur Erzielung eines mucoadhäsiven Effekts wird Carbopol 980 in Arzneibuchqualität USP XXV verwendet (Caelo, D-Hilden). Carbopol 980 ist Polyacrylsäure mit einem Molekulargewicht von 4000000, die eine gute Augenschleimhautverträglichkeit zeigt [Fiedler 1996] und die im Folgenden auch als CP980 bezeichnet wird.

Sorbitol

Isotonieeinstellungen werden immer mit Sorbitol durchgeführt, das in Arzneibuchqualität Ph.Eur. 1997 von der Firma Caelo (D-Hilden) bezogen wird.

Thiomersal

Zur Konservierung wässriger Zubereitungen wird Thiomersal in Qualität nach DAC 2000 verwendet (Caelo, D-Hilden).

Wasser

Wasser wird ausschließlich in bidestillierter Qualität verwendet.

Sonstige Materialien

Materialien, die ausschließlich bei den angewandten Methoden eingesetzt werden, werden im entsprechenden Abschnitt unter 3.2 berücksichtigt.

3.2 Methoden

3.2.1 Herstellung von erstarrten invers mizellaren Lösungen (SRMS)

Eine binäre Mischung aus 30-60 % (m/m) Lecithin und S100 oder S142 wird bei einer Temperatur von 60 °C mit Hilfe eines Magnetrührers bis zur transparenten, gelben Schmelze gerührt. Anschließend wird diese homogene Schmelze unter Rühren bei Raumtemperatur erstarren gelassen, wobei das Lösen von Arzneistoffen in der Schmelze analog Abschnitt 3.2.2 vor dem Erstarren erfolgt. Nach der Charakterisierung der verschiedenen SRMS wird zur Herstellung von Nanosuspensionen und deren weiterer Charakterisierung eine 1:1 (m/m) Mischung von Lecithin und Hartfett gewählt. Diese festen 1:1 (m/m) Mischungen werden in Abhängigkeit vom verwendeten Hartfett als SRMS100 bzw. SRMS142 bezeichnet.

3.2.2 Bestimmung der Arzneistoffsolubilisation in den SRMS

Um die Arzneistoffsolubilisation in Lecithin-Hartfett-Mischungen zu untersuchen, werden Pilocarpin-Base, Estradiol und Hydrocortison direkt zur Schmelze der SRMS gegeben und bei 60 °C unter Rühren solubilisiert. Pilocarpin-HCl wird in Form einer wässrigen Lösung (33,3 % (m/m)) zugefügt. Das zugesetzte Wasser, durch das eine partielle Transformation der Schmelze in eine lamellare Mesophase erfolgt [Friedrich et al. 2000], wird unter Rühren bei 60 °C verdunsten gelassen. Die maximal solubilisierbare Arzneistoffkonzentration wird makroskopisch bei einer Temperatur von 60 °C in Konzentrationsschritten von 0,5 % (m/m) bestimmt und ist die höchste Konzentration, bei der noch eine klare Schmelze erhalten wird.

3.2.3 Herstellung von Nanosuspensionen (Entwicklung)

Die SRMS100- oder SRMS142-Masse wird mit einem Mörser 15-20 min in flüssigem Stickstoff gemahlen (7 Mahlprozesse) und das noch gefrorene SRMS-Pulver anschließend in der Emulgatorlösung dispergiert. Dieses erfolgt während des Screenings der Emulgatorkonzentration über 20 min per Magnetrührer, bei allen anderen Versuchen erfolgt die Dispergierung über 90 s mit einem Ultra-Turrax T25 basic (Ika, D-Staufen) bei einer Geschwindigkeit von 13000 min^{-1} (Aufsatz S25N-18G) oder 16000 min^{-1} (Aufsatz S25N-10G). Während der Entwicklung werden Lipidgehalte von 5 und 15 % (m/m) SRMS verwendet. Nach dem Screening der Emulgatorkonzentra-

tion werden die Systeme mit einem Emulgator/SRMS-Verhältnis von 1:5 (m/m) hergestellt und mit 0,005 % (m/m) Thiomersal konserviert mit Ausnahme derjenigen, die mit Eisbadkühlung hergestellt werden.

Zur Herstellung der Nanosuspensionen werden die Vordispersionen in einem EmulsiFlex-C5 Kolben-Spalt-Homogenisator (Avestin, CAN-Ottawa) hochdruckhomogenisiert. Das Gerät ist in Abbildung 3.4 dargestellt.



Abbildung 3.4: Avestin EmulsiFlex-C5 Hochdruckhomogenisator.

Die Vordispersion wird zunächst zweimal ohne Druck durch das Gerät gepumpt, um größere Agglomerate zu zerteilen, und danach diskontinuierlich bei einem Homogenisierdruck von 1000 oder 1500 bar für bis zu 30 Passagen hochdruckhomogenisiert. Dabei werden folgende Bedingungen zur Temperatureinstellung verwendet:

1. Keine Temperatureinstellung (Homogenisation bei Raumtemperatur).
2. Eine Kühlschlange hinter dem Auslassrohr wird in Eiswasser getaucht.
3. Die produktführenden Bereiche des Homogenisators inklusive der Kühlschlange (Bed. 2) werden in Eiswasser getaucht.

Für das Screening der Emulgatorkonzentration wird Bedingung 3 verwendet. Um eine sichere Rekristallisation der Hartfette zu gewährleisten, werden die Suspensionen nach der Herstellung über Nacht bei einer Temperatur von 4-8 °C im Kühlschrank gelagert.

3.2.4 Herstellung der Nanosuspensionen (optimiertes System)

Optimierte arzneistofffreie Systeme enthalten 15 % (m/m) SRMS100 oder SRMS142 als Lipidmatrix und ein PS80/SRMS-Verhältnis von 1:5 (m/m). Die Systeme werden mit 0,005 % (m/m) Thiomersal (bezogen auf das gesamte System) konserviert und mit 4,75 % (m/m) Sorbitol (bezogen auf die wässrige Phase ohne PS80) isotonisiert. Die Herstellung erfolgt analog Abschnitt 3.2.3, wobei die Vordispersierung immer per Ultra-Turrax durchgeführt wird und die Hochdruckhomogenisation nach zweimaligem Durchlaufen ohne Druck über 20 kontinuierliche Passagen erfolgt. Dabei wird ein Druck von 1000 bar für SRMS100-haltige und 1500 bar für SRMS142-haltige Nanosuspensionen angelegt und das Gerät nicht temperiert, d.h. dass die Herstellung bei Raumtemperatur erfolgt.

Die Rezepturmerkmale Emulgator/SRMS-Verhältnis, Konservierung und Isotonisierung gelten prinzipiell auch für arzneistoffhaltige Systeme, deren genaue Rezepturen Kapitel 4.5 zu entnehmen sind.

3.2.5 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) gefriergebrochener und replizierter Proben

Zur Replizierung werden die Systeme zunächst zwischen zwei Goldträgern in schmelzendem Stickstoff von -210 °C unter Erhalt ihrer kolloidchemischen Struktur schockgefroren. Das Brechen der tiefgefrorenen Proben erfolgt anschließend im Rezipienten einer Gefrierbruchätzanlage BAF 400 (Balzers, D-Wiesbaden) bei -100 °C und einem Druck von $5 \cdot 10^{-6}$ bar. Zur Herstellung des Replikums werden die Bruchflächen unter einem Winkel von 45° mit einer 2 nm dicken Platin-Kohle-Schicht beschattet und zur mechanischen Stabilisierung unter einem Winkel von 90° mit einer 20 nm dicken Schicht reiner Kohle bedampft. Die erhaltenen Replika werden nach Reinigung mit konzentrierter Schwefelsäure und mit Wasser auf Kupfernetzen entweder mit einem Transmissionselektronenmikroskop EM 300 (Philips, D-Kassel) bei 80 kV oder mit einem Leo 922 (Leo, D-Oberkochen) bei 100 kV untersucht.

Im Gegensatz zu den Nanosuspensionen, die direkt nach Platzieren zwischen den Goldträgern schockgefroren werden, wird Hartfetten und Lecithin-Hartfett-Mischungen, die als Schmelze aufgetragen werden, die Möglichkeit zur Rekristallisation gegeben. Das Einfrieren und Brechen dieser Proben erfolgt nach einem Tag der Lagerung zwischen den Trägern.

3.2.6 Polarisationsmikroskopie

Polarisationsmikroskopische Untersuchungen werden mit einem Photomikroskop Typ III (Zeiss, D-Oberkochen) durchgeführt, welches mit gekreuzten Polarisatoren ausgestattet ist. Schwarzweiße Texturen erscheinen durch Erzeugung eines zusätzlichen Gangunterschiedes von 550 nm mittels eines λ -Plättchens farbig. Um temperaturabhängige Effekte zu beobachten, wird ein Heiztisch FP 52 mit einem Steuergerät FP 5 (Mettler, D-Gießen) verwendet.

3.2.7 Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS)

Zur Bestimmung des hydrodynamischen Durchmessers äquivalenter Kugeln von Partikeln werden PCS-Messungen mit einem Zetasizer 3 (Malvern, D-Herrenberg), der mit einem He/Ne-Laser 35 mW des Modells 127 (Spectra Physics, USA-Mt. View) ausgestattet ist, durchgeführt. Um zu gewährleisten, dass sich die Partikel frei im Dispersionsmedium bewegen können, sodass Mehrfachstreuung vermieden wird, werden wässrige Suspensionen mit filtriertem, bidestilliertem Wasser verdünnt. Die Proben werden in einer runden Messzelle AZ10, die auf 20 °C temperiert ist, unter einem Winkel des Photomultipliers von 90° untersucht. Lecithin-Hartfett-Mischungen werden unverdünnt bei 50 °C in der Schmelze vermessen. Jede Messung hat eine Dauer von 120 s, unterteilt in 10 Einzelmessungen von 12 s. Aus diesen 10 Messungen wählt die Software die besten aus und errechnet den z-average, einen gemittelten, intensitätsgewichteten Partikeldurchmesser.

3.2.8 Bestimmung des Zetapotentials

Die elektrophoretische Mobilität wird in einer Mikroelektrophoresezelle AZ4 eines Zetasizer 3 (Malvern, D-Herrenberg) nach der Methode der Laser-Doppler-Anemometrie bestimmt. Die Proben werden mit 0,001M-NaCl-Lösung pH 7 verdünnt, die gleiche Lösung wird als Elektrolyt verwendet. Die Messungen erfolgen im Kreuzstrahlbetrieb bei einer Modulationsfrequenz von 1000 Hz und einer angelegten Spannung von 150 V. Das Zetapotential wird mit Hilfe der Auswertungssoftware näherungsweise aus der elektrophoretischen Mobilität berechnet.

3.2.9 Röntgenweitwinkeldiffraktometrie (WAXD)

Die Untersuchung von Kristallgitterabständen der Nahordnung erfolgt mit der Röntgenweitwinkeldiffraktometrie (WAXD). Lecithin-Hartfett-Mischungen werden in Aluminiumträger eingestrichen oder eingeschmolzen und mit einem Röntgengoniometer PW 1050/25 (Philips, D-Kassel) vermessen. Die Detektion erfolgt mit einem Xe-Proportionalitätszählrohr PW 1711/10 und anschließender Auswertung der Interferenzen mit der Analysesoftware PC-APD (Philips, D-Kassel). Das Goniometer wird auf einem Röntgengenerator PW 1710 mit einer Röhre PW 2213/20 (Ni-Filter, CuK_α -Strahlung, $\lambda=0,154$ nm) bei einer Beschleunigungsspannung von 40 kV und einem Anodenstrom von 25 mA betrieben.

WAXD-Untersuchungen flüssiger Systeme werden über 12 h in einer rotierenden Glaskapillare mit einer Debye-Scherrer Röntgenkamera PW 1024/10 (Philips, D-Kassel) durchgeführt. Die Kamera ist mit einem Röntgengenerator PW 1830, der eine Röhre PW 2253/11 (Ni-Filter, CuK_α -Strahlung, $\lambda=0,154$ nm) beinhaltet, verbunden. Die Betriebsspannung beträgt dabei wiederum 40 kV und der Anodenstrom 40 mA. Die Detektion von Interferenzen erfolgt mit einem Structurix D7 FW Röntgenfilm (Agfa-Gevaert, B-Mortsel).

Die Berechnung von Gitterabständen aus den registrierten Interferenzen erfolgt über die Bragg'sche Gleichung

$$n \cdot \lambda = 2 \cdot d \cdot \sin\theta \quad (\text{Gl. 3.1})$$

wobei n die Ordnung der Interferenz, λ die Wellenlänge der Röntgenstrahlung, d der Gitterabstand und θ der Glanzwinkel ist.

3.2.10 Dynamische Differenzkalorimetrie (DSC)

Thermoanalytische Untersuchungen werden mit einem Differential Scanning Calorimeter DSC 220 C mit Diskstation SSC 5200 H (Seiko, J-Tokyo) durchgeführt. Die Proben werden in Aluminiumtiegel (Seiko, J-Tokyo) kaltverschweißt und, wenn nichts anderes angegeben ist, in einem Temperaturbereich von 2-60 °C bzw. 2-75 °C mit einer Heizrate von 5 °C/min gegen einen entsprechenden Leertiegel vermessen. Die Einwaage, sowohl für Lecithin-Hartfett-Mischungen, als auch für flüssige Suspensionen, beträgt 5 mg. Zur Auswertung von Phasenumwandlungstemperaturen und -enthalpien steht die geräteeigene Analysesoftware zur Verfügung.

3.2.11 pH-Wert-Bestimmung

Der pH-Wert von Lösungen und Nanosuspensionen wird mit einem Microprocessor pH-Meter pH 539 (Wissenschaftlich-Technische Werkstätten, D-Weilheim) ermittelt, wobei die Kalibrierung der Glaselektrode mit Standardpufferlösungen pH 4,66 und 9,00 (Merck, D-Darmstadt) erfolgt.

3.2.12 Bestimmung der Osmolalität

Zur Bestimmung der Osmolalität der Systeme wird ein Knauer Halbmikro-Osmometer (Knauer, D-Berlin) verwendet, das mit Wasser und NaCl-Lösung (400 mosmol/kg) kalibriert wird.

3.2.13 Dichtebestimmung

Die Dichte von Nanosuspensionen sowie wässrigen und öligen Lösungen wird mit einem digitalen Dichtemesser DMA 46 (Anton Paar, A-Graz) bei 20 °C bestimmt. Die Kalibrierung des Geräts erfolgt durch Messungen von bidestilliertem Wasser und Luft bei 20 °C.

3.2.14 Kapillarviskosimetrie

Verdünnte arzneistofffreie Nanosuspensionen werden mit einem Ubbelohde Kapillarviskosimeter (Schott, D-Hofheim) des Typs 52503/0c (Gerätekonstante $k=0,002745$) untersucht. Das Viskosimeter wird in einem Wasserbad mittels eines Einhängethermostaten E3 (Haake, D-Karlsruhe) auf $20,0 \pm 0,1$ °C temperiert. Die Durchlaufzeit t der Suspensionen wird mit einer Stoppuhr gemessen (ca. 7 min) und die kinematische Viskosität ν gemäß der Gleichung

$$\nu = k \cdot t \quad (\text{Gl. 3.2})$$

berechnet, die durch Multiplikation mit der jeweiligen Probendichte ρ gemäß

$$\eta = \nu \cdot \rho \quad (\text{Gl. 3.3})$$

in die entsprechende dynamische Viskosität η umgerechnet wird. Mit Hilfe der dynamischen Viskosität η_0 des reinen Dispersionsmediums wird über

$$\eta_{\text{spez.}} = \frac{\eta - \eta_0}{\eta_0} \quad (\text{Gl. 3.4})$$

die spezifische Viskosität $\eta_{\text{spez.}}$ ermittelt. Die normierte spezifische Viskosität $\eta_{\text{spez.}}/c_{\text{Partikel}}$ wird über der Partikelkonzentration c_{Partikel} (m/V) aufgetragen und durch Extrapolation auf die Konzentration null die jeweilige intrinsische Viskosität $[\eta]$ graphisch ermittelt. Die Bestimmung der Halbachsenverhältnisse der Partikel erfolgt anhand der ermittelten intrinsischen Viskosität aus der Literatur [Adam 1988].

3.2.15 Rotationsviskosimetrie

Rheologische Untersuchungen werden an einem Rheometer CVO 50 (Bohlin Instruments, GB-Cirencester) durchgeführt. Als Messgeometrie für die Rotationsviskosimetrie dient die Kegel-Platte-Einrichtung CP 1/40 mit einem Kegelöffnungswinkel von 1° und einem Durchmesser des Kegels von 40 mm. Die Höhe des Messspalts beträgt hierbei 30 μm . Die Kegel-Platte-Einrichtung wird mittels eines Thermostaten FP50-HC R22 (Bohlin Instruments, GB-Cirencester) auf $20,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ temperiert und die Messgrößen mit der geräteeigenen Software (v05.61.02) berechnet.

Die Bestimmung der Fließgrenze der Systeme sowie die Aufnahme von Rheogrammen erfolgt durch das Anlegen einer Schubspannungsrampe im Bereich von 0,03-5 Pa. Diese Rampe umfasst bei der Fließgrenzenermittlung 20 Messwerte in 30 s. Bei der Erstellung von Rheogrammen wird die Schubspannung in Auf- und in Abwärtsrichtung aufgegeben, wobei jeweils 30 Messwerte in 30 s ermittelt werden. Die Viskosität der Suspensionen wird bei einer konstanten Schubspannung von 2 Pa mit 20 Messwerten pro Einzelmessung bestimmt.

3.2.16 Oszillationsrheologische Untersuchungen mucoadhäsiver Effekte

Ausgewählte Proben werden auf ihre mucoadhäsiven Eigenschaften geprüft. Es handelt sich dabei um arzneistofffreie Nanosuspensionen mit einem Lipidanteil von 15 % (m/m), die als Original, unter Zusatz von 0,05 % (m/m) Carbopol 980, sowie unter Zusatz von 0,05 % (m/m) Carbopol 980 und anschließender Einstellung auf $\text{pH } 7,4 \pm 0,1$ untersucht werden. Die Polyacrylsäure wird mit einem Magnetrührer über 24 h bei Raumtemperatur in den Nanosuspensionen dispergiert, eine anschließende Einstellung des pH-Wertes erfolgt mit 0,1N-NaOH. Zum Nachweis mucoadhäsiver Effekte werden drei Messreihen untersucht:

1. 1:1 (m/m) Mischungen der Systeme mit einer Mucin-Dispersion (MUC)
2. 1:1 (m/m) Mischungen der Systeme mit simulierter Tränenflüssigkeit (SLF)
3. 1:1 (m/m) Mischung von MUC und SLF

Alle Mischungen werden durch 16stündiges Rühren bei Raumtemperatur mit einem Magnetrührer homogenisiert. Bei der simulierten Tränenflüssigkeit handelt es sich um eine Elektrolytlösung, die 1,7893 g/l KCl, 6,3118 g/l NaCl, 2,1842 g/l NaHCO₃, 44,4 mg/l CaCl₂ und 47,6 mg/l MgCl₂ (alle: Merck, D-Darmstadt) enthält [Van Haeringen 1981]. Die Einstellung auf den physiologischen pH ($7,4 \pm 0,1$) erfolgt mit 0,1N-HCl. Zur Herstellung einer 16 %igen (m/m) Mucin-Dispersion wird Mucin Typ II (Sigma-Aldrich, D-Steinheim), d.h. unbehandeltes Mucin aus dem Schweinemagen, über 24 h per Magnetrührer in simulierter Tränenflüssigkeit dispergiert.

Die oszillationsrheologische Untersuchung der Mischungen erfolgt mit einem Rheometer CVO 50 (Bohlin Instruments, GB-Cirencester) bei einer Temperatur von $20,0 \pm 0,1$ °C. Verwendet wird hierbei die Kegel-Platte-Einrichtung CP 1/20 mit einem Kegelöffnungswinkel von 1°, einem Durchmesser des Kegels von 20 mm und einem Messspalt von 30 µm in der Höhe. Die Messungen werden im linear viskoelastischen Bereich bei einer Frequenz von 0,01 Hz und einer angelegten Schubspannung von 0,5 Pa vorgenommen, wobei pro Einzelmessung 5 Messwerte ermittelt werden. Aus den erhaltenen Messgrößen elastischer Modul G' (Speichermodul) und viskoser Modul G'' (Verlustmodul) wird jeweils ein G' bzw. G'' basierter mucoadhäsiver Index MAI der Systeme gemäß den Gleichungen 3.5 und 3.6 berechnet [Rossi et al. 1995].

$$MAI_{(G')} = G'_{(\text{System/MUC})} - [G'_{(\text{System/SLF})} + G'_{(\text{MUC/SLF})}] \quad (\text{Gl. 3.5})$$

$$MAI_{(G'')} = G''_{(\text{System/MUC})} - [G''_{(\text{System/SLF})} + G''_{(\text{MUC/SLF})}] \quad (\text{Gl. 3.6})$$

3.2.17 HPLC-Bestimmung der Arzneistoffe

Alle Arzneistoffgehalte, mit Ausnahme von permeiertem Estradiol (vgl. Abschnitt 3.2.18), werden mittels Hochleistungs-Flüssigchromatographie (HPLC) bestimmt. Die Untersuchungen erfolgen mit einem HPLC-System der Fa. Waters (D-Eschborn), das aus einem Pumpensystem 515, einem Autosampler 717 plus sowie einem UV-Detektor 486 besteht. Die Auswertung erfolgt mit der Waters Millennium 32 Chromatography Manager Software (Waters, D-Eschborn).

Pilocarpin

RP-Säule Gromsil 120 ODS - 3 CP 5 µm 125x4 mm (Grom, D-Herrenberg), mobile Phase: 23 Teile (V/V) Acetonitril (Acros Organics, B-Geel) und 77 Teile (V/V) Phosphatpuffer pH 7,0 (6,8 g/l KH₂PO₄, 1,66 g/l KOH, Merck, D-Darmstadt), Flussrate: 1,0 ml/min [Papantoniou 1995], Retentionszeit: 2,7 min, Detektion: λ=215 nm, Mehrpunkt-Kalibrierung im Bereich 5-25 µg/ml (R>0,999).

Estradiol

RP-Säule Hypersil ODS 5 µm 250x4 mm (Grom, D-Herrenberg), Vorsäule Hypersil ODS 5 µm 10x4 mm, mobile Phase: 45 Teile (V/V) Essigsäure 2 % (V/V) (J.T. Baker, NL-Deventer), 45 Teile (V/V) Acetonitril (Acros Organics, B-Geel) und 10 Teile (V/V) Isopropanol (Riedel-de Haën, D-Seelze), Flussrate: 1,0 ml/min [Schicksnus und Müller-Goymann 2002], Retentionszeit: 5,5 min, Detektion: λ=280 nm, Mehrpunkt-Kalibrierung im Bereich 0,1-30 µg/ml (R>0,999).

Hydrocortison

RP-Säule Hypersil ODS 5 µm 250x4 mm (Grom, D-Herrenberg), mobile Phase: 60 Teile (V/V) Methanol (Fisher Scientific, GB-Loughborough) und 40 Teile (V/V) Wasser, Flussrate: 1,1 ml/min [Way und Hadgraft 1991], Retentionszeit: 5,0 min, Detektion: λ=250 nm, Mehrpunkt-Kalibrierung im Bereich 0,1-25 µg/ml (R>0,9999).

3.2.18 ELISA-Bestimmung von Estradiol

Die Bestimmung von Estradiolgehalten aus Permeationsversuchen erfolgt mit einem 17β-Estradiol ELISA Kit (IBL, D-Hamburg). Bei dem ELISA handelt es sich um einen kompetitiven Enzymimmunoassay, bei dem zunächst ein enzymmarkiertes Antigen mit vorhandenem Estradiol um Bindungsstellen von, in den Wells fixierten, Antikörpern konkurriert. Nach Waschen wird eine Substratlösung für eine bestimmte Zeit einwirken gelassen, die Farbentwicklung gestoppt und die Extinktion der entstandenen gelben Färbung mit einem Mikrotiterplatten-Reader Wallac 1420 Victor² (Perkin Elmer, FIN-Turku) vermessen. Dabei ist die Intensität umgekehrt proportional zu den Estradiolkonzentrationen in den Standards (0-2000 pg/ml Estradiol, wf.) und den Proben.

3.2.19 Bestimmung der Beladungskapazität

Versuche, die Lipidnanopartikel per Zentrifugation zu separieren, werden mit einer Ultrazentrifuge HIMAC CP80 α (Hitachi, J-Tokyo) mit einem Rotor 5-P80AT unter Kühlung bei bis zu 600000xG durchgeführt.

Zur indirekten Ermittlung der Arzneistoffbeladung der Partikel werden die Nano-suspensionen zunächst durch einen Zentrifugenkonzentrator Vivaspin 20 (Vivascience, D-Hannover, Abbildung 3.5) zentrifugiert. Bei dem Vivaspin 20 handelt es sich um ein Zentrifugenröhrchen, in dessen Mitte sich ein senkrecht stehender Membranfilter mit einem MWCO von 100 kDa befindet. Die Zwangsfiltration erfolgt dabei über 90 min bei 10 °C und 6000xG in einer Beckman Coulter Allegra 64R Zentrifuge (Beckman Coulter, USA-Palo Alto, Cal.) mit einem C0650 Rotor. Das Filtrat wird anschließend per HPLC untersucht (vgl. Abschnitt 3.2.17) und per Differenzbildung auf die Beladung der Partikel rückgeschlossen.



Abbildung 3.5: Zentrifugenkonzentrator Vivaspin 20.

3.2.20 Freisetzungsuntersuchungen

Die Freisetzung von Estradiol aus den Systemen wird mit Hilfe einer modifizierten Franz-Zelle [Franz 1975] bei 20 und 37 °C untersucht. Die modifizierte Franz-Zelle ist in Abbildung 3.6 dargestellt.

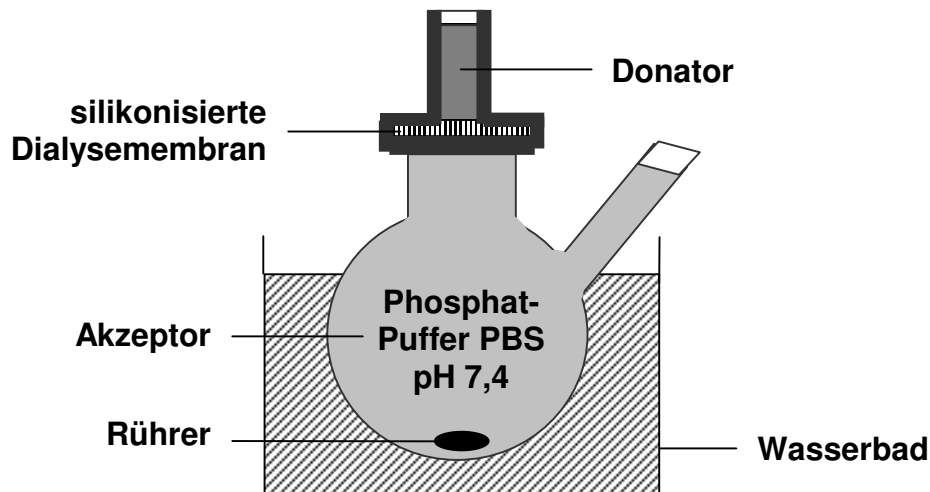


Abbildung 3.6: Modifizierte Franz-Zelle.

Etwa 1,0 g des jeweiligen Systems dient als Donator, als Akzeptormedium werden 6,7-7,5 ml isotonischer, salinischer Phosphatpuffer pH 7,4 (PBS) eingesetzt (ICN Biomedicals, D-Eschwege). Dabei sorgt ein Magnetrührer (500 min^{-1}) für die Dauer des Versuchs für eine gleichmäßige Durchmischung des Akzeptors. Die für die Arzneistofffreisetzung zur Verfügung stehende Fläche zwischen Donator und Akzeptorkompartiment beträgt $61,1\text{-}65,8 \text{ mm}^2$, wobei die Kompartimente durch eine silikonisierte Dialysemembran Spectra/Por MWCO 6000-8000 (Spectrum Medical Industries, USA-Los Angeles, Cal.) voneinander abgetrennt werden.

Die Dialysemembran wird mit Polymethylsiloxan imprägniert, um einen Wasserdurchtritt zu verhindern. Dazu wird die Membran zunächst für 2 min in Wasser hydratisiert, beide Hälften des Schlauchs voneinander getrennt und die Einzelstücke abermals für 2 min in Wasser eingelegt. Anschließend werden die Membranen in eine 2 %ige (V/V) Lösung von Silikonöl AK 350 (Wacker, D-Burghausen) in Diethylether (Grüssing, D-Filsum) überführt und für 2 min bewegt. Nach Verdunstung des Ethers werden die Membranen in die Franz-Zellen eingespannt, wobei die Schlitze zuvor mit Silikonfett Baysilone (Bayer, D-Leverkusen) behandelt werden, um absolute Dichtigkeit zu gewährleisten. Die Zellen werden senkrecht positioniert, 0,5 ml der 2 %igen (V/V) Silikonöllösung auf die Freisetzungsfläche aufgebracht und der Ether über Nacht verdunsten gelassen [Stoye 1997].

Während des Freisetzungsversuchs werden zu definierten Zeitpunkten Proben von $250 \mu\text{l}$ über einen Zeitraum von 24 h mit Hilfe einer $250 \mu\text{l}$ -Hamilton-Spritze (Hamil-

ton, CH-Bonaduz) gezogen, entnommene Probenvolumina werden umgehend durch frischen Puffer gleicher Temperatur ersetzt. Die Öffnungen der Franz-Zelle werden zur Vermeidung von Verdunstungseffekten mit Parafilm (Pechiney Plastic Packaging, USA-Menasha, WI) und Tesafilm abgedichtet. Freigesetzte Estradiolmengen werden mit einer HPLC-Analytik (Abschnitt 3.2.17) bestimmt.

3.2.21 Permeationsuntersuchungen

Die Untersuchung der Permeationsrate der Arzneistoffe aus den verschiedenen Systemen erfolgt unter Verwendung eines humanen, organotypischen Cornea-Konstrukts nach Reichl et al. (2004). Bei dem Cornea-Konstrukt handelt es sich um ein dreischichtig aufgebautes Gewebe aus Endothel, Stroma und Epithel.

Die Untersuchungen finden analog den Freisetzungsuntersuchungen in modifizierten Franz-Zellen (Abb. 3.6) bei einer Temperatur von 37 °C statt. Als Donator dienen die entwickelten Nanosuspensionen sowie ölige und wässrige Lösungen der Arzneistoffe, als Akzeptormedium wird wiederum isotonischer, salinischer Phosphatpuffer pH 7,4 (PBS) eingesetzt (ICN Biomedicals, D-Eschwege), der per Magnetrührer (500 min^{-1}) gleichmäßig durchmischt wird. Die Permeationsfläche beträgt $4,91 \text{ mm}^2$ und das Akzeptorvolumen liegt je nach Messzelle bei 6,4-7,4 ml. Die Probenentnahme erfolgt stündlich über einen Zeitraum von 7 h, wobei das entnommene Probenvolumen von 250 μl umgehend durch frischen Puffer gleicher Temperatur ersetzt wird und die Öffnungen der Franz-Zelle anschließend wieder mit Parafilm und Tesafilm abgedichtet werden. Permeierte Mengen an Pilocarpin und Hydrocortison werden mittels einer HPLC-Analytik (Abschnitt 3.2.17) bestimmt, die Quantifizierung von permeiertem Estradiol erfolgt per ELISA (Abschnitt 3.2.18).

3.2.22 Prüfung auf signifikante Unterschiede von Mittelwerten (*t*-Test)

Die Überprüfung auf signifikante Unterschiede der Mittelwerte bei Freisetzungs- und Permeationsuntersuchungen sowie den rheologischen Tests erfolgt mittels zweiseitigem *t*-Test unter Annahme bzw. Ablehnung der Nullhypothese H_0 mit $\alpha=5\%$ (α =Irrtumswahrscheinlichkeit). Vor Durchführung des *t*-Tests wird auf Homogenität der Streuung gemäß *F*-Test geprüft [Bauer et al. 2002].

4 Versuchsergebnisse und Diskussion

4.1 Überlegungen zur Modellauswahl

Invers mizellare Lösungen aus Lecithin, gelöst in einem öligen Träger, transformieren in eine lamellare Mesophase, wenn sie mit Wasser in Kontakt treten [Hamann 1990, Papantoniou und Müller-Goymann 1995a]. Durch eine applikationsinduzierte Transformation ist somit eine kontrollierte Freigabe von solubilisierten Wirkstoffen möglich [Müller-Goymann und Hamann 1993, Papantoniou und Müller-Goymann 1995b, Schneeweis und Müller-Goymann 1997]. Schneeweis und Müller-Goymann (2000) zeigten auch, dass mit einem festen Analogon, d.h. Lecithin-Hartfett-Mischungen, eine verzögerte Freisetzung erzielt werden kann, wenn die feste invers mizellare Lösung am Applikationsort zunächst schmilzt und mit vorhandenem Wasser zur Mesophase transformiert.

Neben dem Aspekt einer kontrollierten Wirkstofffreisetzung bieten invers mizellare Lösungen zusätzlich den Vorteil, Arzneistoffe gut solubilisieren zu können [Papantoniou und Müller-Goymann 1995a].

Papantoniou (1995) untersuchte die Arzneistoffpermeation durch exzidierte porcine Cornea aus einer Lösung von 30 % (m/m) Lecithin in Isopropylmyristat. Dieses System wurde ebenfalls von Tegtmeyer et al. (2001) sowie Reichl und Müller-Goymann (2001) für Permeationsuntersuchungen verwendet. Auch Schneeweis (1999) arbeitete mit einem System aus 30 % (m/m) Lecithin, das in Hartfett eingearbeitet war. Dieses System wurde als Suppositorium eingesetzt, um eine verlängerte rektale Arzneistofffreisetzung zu erzielen.

Da das Ziel dieser Arbeit die Entwicklung disperser wässriger Systeme als Alternative zu öligen Augentropfen ist und die Arzneistoffe möglichst quantitativ in der dispersen Phase lokalisiert sein sollen, muss die Beladungskapazität der Partikel entsprechend groß sein. Die Matrix für die Lipidnanopartikel soll daher aus Lecithin-Hartfett-Mischungen bestehen, wobei, im Vergleich zu den oben beschriebenen Systemen, die Solubilisation von Arzneistoffen noch weiter erhöht sein muss, da ein disperses System mit entsprechender Verdünnung der Lipidphase und nicht ein unverdünntes öliges System angewendet wird. Aus diesem Grund werden Versuche mit höheren Lecithingehalten durchgeführt.

4.2 Charakterisierung von Lecithin-Hartfett-Mischungen

In diesem Abschnitt wird auf die physikochemischen Eigenschaften fester invers miszellerer Lösungen, d.h. Lecithin-Hartfett-Mischungen, eingegangen und der Einfluss des Phospholipids auf die festen Lipide untersucht. Zusätzlich wird die Solubilisationsfähigkeit der Systeme für die Arzneistoffe Pilocarpin-Base, Pilocarpin-HCl, Estradiol und Hydrocortison untersucht.

4.2.1 Charakterisierung arzneistofffreier Lecithin-Hartfett-Mischungen

4.2.1.1 Herstellung der Lecithin-Hartfett-Mischungen

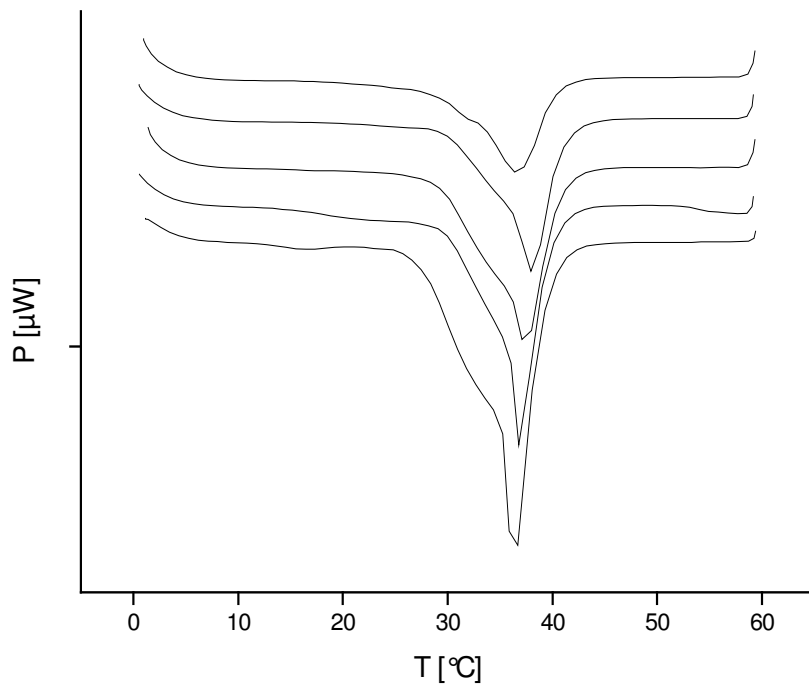
Hergestellt werden Systeme mit 30-60 % (m/m) Lecithin, das bei einer Temperatur von 60 °C auf dem Magnetrührer in den geschmolzenen Hartfetten S100 bzw. S142 gelöst wird. Eine Konzentration von 30 % (m/m) wurde von Papantoniou (1995) und Schneeweis (1999) in ihren Arbeiten verwendet und wird als Mindestkonzentration für eine ausreichende Arzneistoffsolubilisierung angesehen.

In allen Fällen entstehen klare, gelbliche Lösungen, wobei das Lösen von 30-50 % (m/m) Phospholipid in der Schmelze eine Zeit von 12-24 Stunden, bei einer Konzentration von 60 % (m/m) zwei Tage (S100) bzw. vier Tage (S142), benötigt. Die höchste untersuchte Konzentration von 60 % (m/m) Lecithin führt im Gegensatz zu den niedrigeren Anteilen zudem zu einer hochviskosen und gallertartigen Schmelze, die beim Gießen nur schwer zu verarbeiten ist.

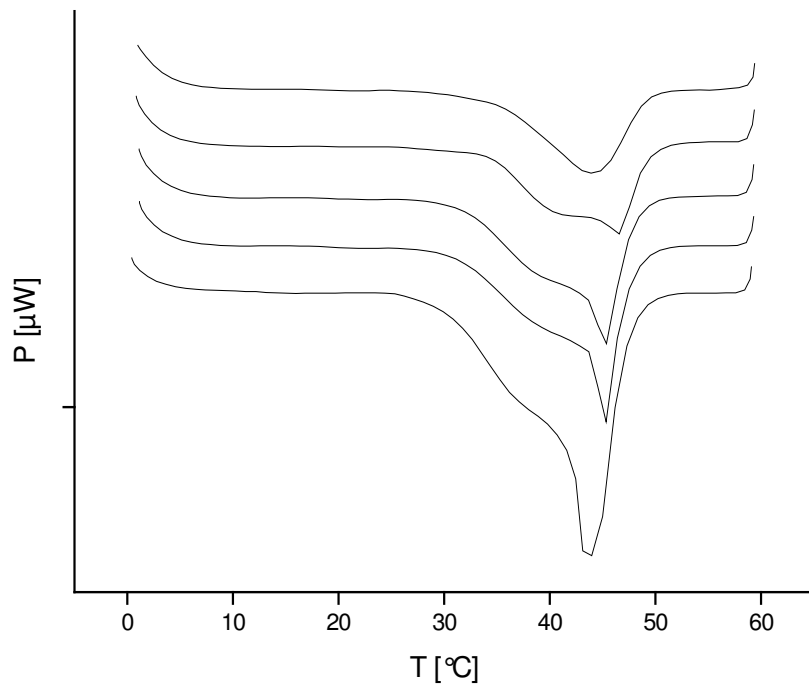
Beim Abkühlen auf Raumtemperatur entstehen aus den Schmelzen gelbliche Massen, wobei sich zwar die Mischungen mit höherem Lecithinanteil zuerst verfestigen, jedoch umso weicher sind, je höher der Anteil an Phospholipid im System ist.

4.2.1.2 DSC-Untersuchungen von Lecithin-Hartfett-Mischungen

Eine wichtige Eigenschaft von Hartfetten ist ihr Schmelzverhalten. Um den Einfluss von Lecithin auf den Schmelzprozess zu charakterisieren, werden die Hartfette sowie deren arzneistofffreie Mischungen mit Lecithin per Dynamischer Differenzkalorimetrie (DSC) untersucht. Abbildung 4.1 zeigt die Thermogramme der Lecithin-Hartfett-Mischungen mit variierendem Gehalt an Lecithin.



a)



b)

Abbildung 4.1: DSC-Thermogramme von a) Lecithin-S100-Mischungen, b) Lecithin-S142-Mischungen mit variierendem P90G-Gehalt von 0, 30, 40, 50, 60 % (m/m) (von unten nach oben).

Die reinen Hartfette zeigen einen Schmelzvorgang mit einem Schmelzübergangsmi-
nimum von 35,5 °C (S100) bzw. 44,1 °C (S142), wobei beide Typen eine ausgepräg-
te Schulter als Einleitung des Schmelzvorgangs aufweisen. Die Breite des Signals
wird durch die breite Fettsäureverteilung der partialsynthetischen Triglyceridgemis-
che verursacht (vgl. Tabelle 3.1). Je nach Steilheit, sowohl der Schulter als auch
des Hauptpeaks, variiert die Onsettemperatur, d.h. der Beginn des Schmelzvor-
gangs. Die Schwankungen dieser Onsettemperaturen sind dadurch so beträchtlich,
dass für die weitere Charakterisierung lediglich das jeweilige Schmelzpeakminimum
des Thermogramms in Betracht gezogen wird. Dieses Minimum kennzeichnet das
vollständige Schmelzen der Probe und ist von der Einwaage der Probe abhängig.
Daher werden die Untersuchungen mit nahezu gleichen Einwaagen durchgeführt
(5,00-5,83 mg).

Durch das Einarbeiten von Lecithin wird das Schmelzverhalten der Lipide nicht be-
einflusst (Abbildung 4.1). Die Schmelzübergänge werden jedoch durch den hohen
Anteil nicht-kristallinen Materials unschärfer und die Peakflächen, und damit die
Schmelzenthalpien, d.h. die Energien, die zum Schmelzen der Kristallgitter erforder-
lich sind, werden kleiner. Den Einfluss des Lecithins auf die Schmelzübergangsmini-
ma der Mischungen als charakteristischen Parameter zeigt Abbildung 4.2.

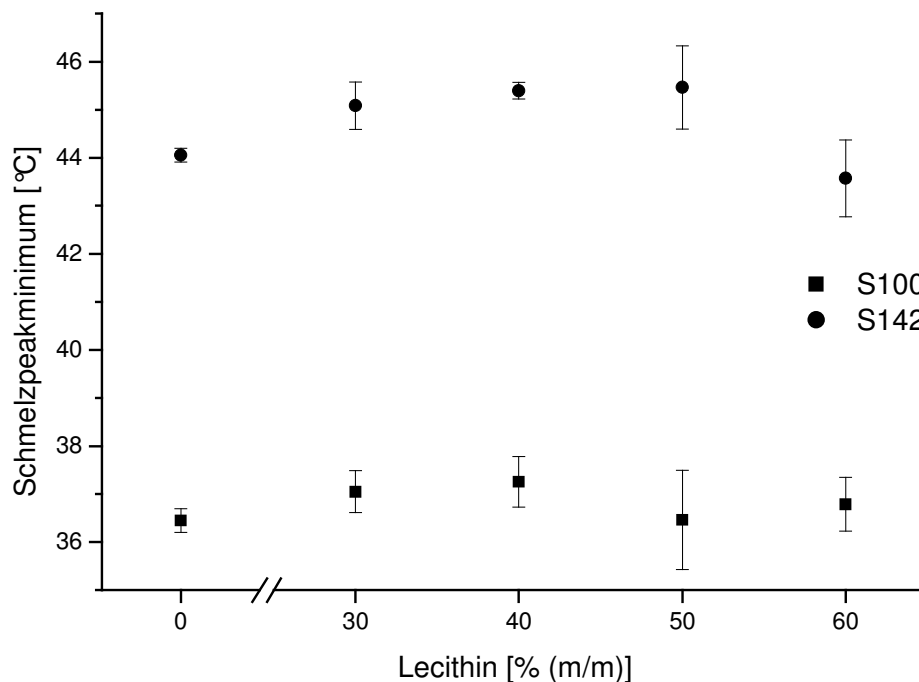


Abbildung 4.2: Schmelzpeakminima der Lecithin-Hartfett-Mischungen (n=4).

Die Peakminima der Mischungen mit S100 werden durch Lecithin nicht verändert. Die Temperaturschwankungen liegen im Bereich von 36,5 bis 37,3 °C, wobei Schwankungen von ± 1 °C bei dieser Meßmethode als nicht signifikant angesehen werden [Refai 2001]. Bei Lecithin-S142-Mischungen sind die Schwankungen größer (43,6-45,5 °C), ein Einfluss des Lecithins auf die Peakminima kann jedoch auch bei diesen Systemen nicht beobachtet werden.

Dies steht im Gegensatz zu Beobachtungen von Schneeweis (1999), der mit Witepsol-Hartfetten eine Erniedrigung des Peakminimums nach Inkorporation von Lecithin um bis zu 5 °C beobachtete. Diese Erniedrigung ist um so ausgeprägter, je höher die Hydroxylzahl des jeweiligen Hartfetts ist. Der Grund dafür liegt in einer Störung polarer Bindungen der Fette, wodurch das Schmelzen bei einer geringeren Temperatur stattfinden kann.

Deutlich beeinflusst durch den Lecithinzusatz wird jedoch die Schmelzenthalpie, d.h. die Energie, die zum Aufschmelzen des Kristallgitters benötigt wird (Abbildung 4.3).

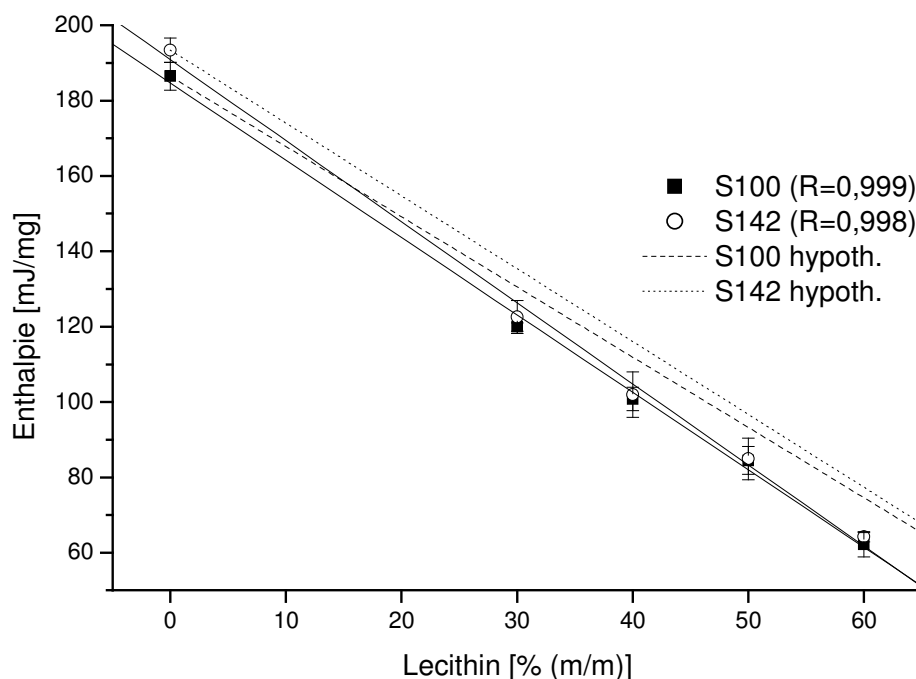


Abbildung 4.3: Schmelzenthalpien der Lecithin-Hartfett-Mischungen in Abhängigkeit vom Lecithingehalt (n=4).

Die Schmelzenthalpie der reinen Hartfette beträgt 186 mJ/mg (S100) bzw. 193 mJ/mg (S142). Eine leichte Erhöhung bei dem höher schmelzenden S142 ist zum einen auf die, zu längeren Ketten verschobene, Fettsäureverteilung (vgl. Tabelle

3.1), zum anderen aber auch auf die etwas höhere Hydroxylzahl dieses Fetts zurückzuführen (12,4 vs. 10,6). Ein Hartfett mit höherer Hydroxylzahl besitzt mehr polare Bindungen, die fester sind und für deren Auftrennung höhere Energien nötig sind als für apolare Bindungen.

Mit steigendem Anteil an Lecithin kommt es zu einer linearen Schmelzenthalpieerniedrigung der Lipide. Da Lecithin ein, bei Raumtemperatur, im wesentlichen flüssig-kristallines System darstellt [Wilisch 1994], ist dieses Absinken mit der Zunahme nicht-kristallinen Materials bzw. umgekehrt mit der direkten prozentualen Abnahme der kristallinen Triglyceride in der Mischung zu erklären. Die lineare Regression für die Absenkung der Schmelzenthalpie führt zu folgenden Geradengleichungen:

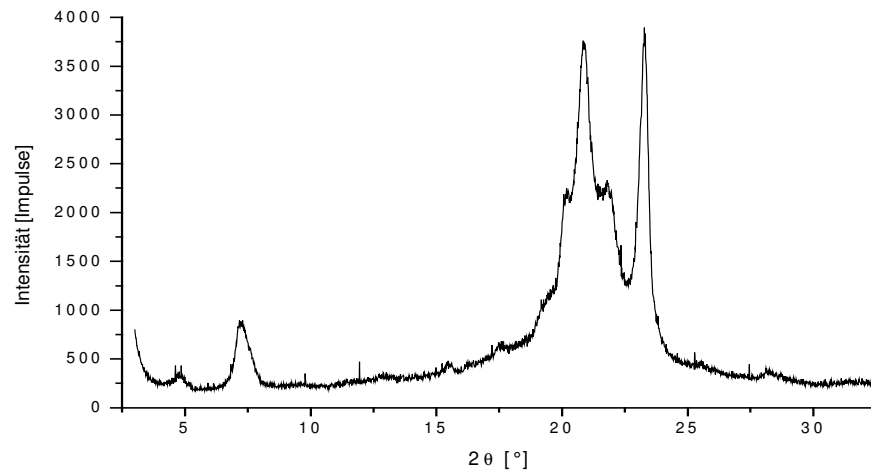
$$\text{S100:} \quad y = -2,05 \cdot x + 184,73 \quad (\text{Gl. 4.1})$$

$$\text{S142:} \quad y = -2,15 \cdot x + 190,88 \quad (\text{Gl. 4.2})$$

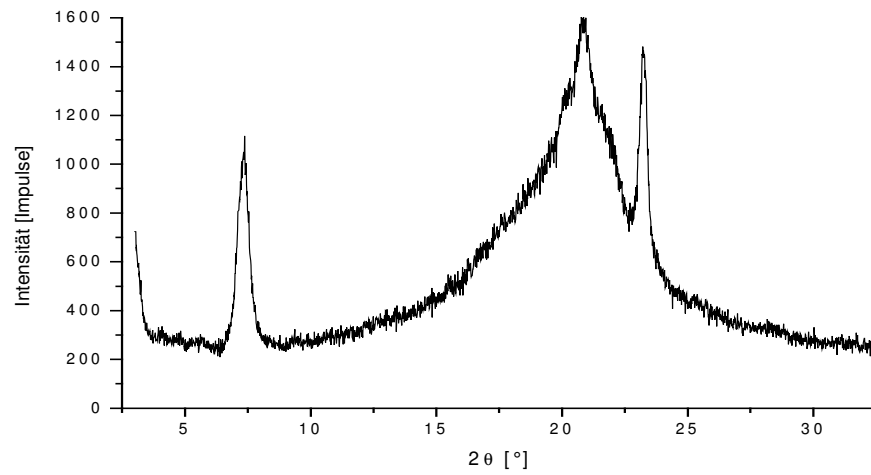
Daraus müsste bei einer Konzentration (x) von 100 % (m/m) Lecithin bzw. 0 % (m/m) Hartfett im System eine Schmelzenthalpie (y) von -20,27 mJ/mg (S100) bzw. -24,12 mJ/mg (S142) resultieren. Dies entspricht bei einer Enthalpie von 0 mJ/mg einer Restkonzentration an nicht-kristallinem Hartfett von 9,9 % (m/m) (S100) bzw. 11,2 % (m/m) (S142). Beide Betrachtungen weisen auf eine Interaktion zwischen den Komponenten hin, die die Rekristallisation und damit die Ordnung der Hartfette, z.B. durch Lösen der Triglyceride in Lecithin, stört. Zur Verdeutlichung sind in Abbildung 4.3 zusätzlich die hypothetischen Geraden der physikalischen Mischungen dargestellt, bei denen keine Wechselwirkungen auftreten dürften.

4.2.1.3 Röntgenuntersuchungen (WAXD) von Lecithin-Hartfett-Mischungen

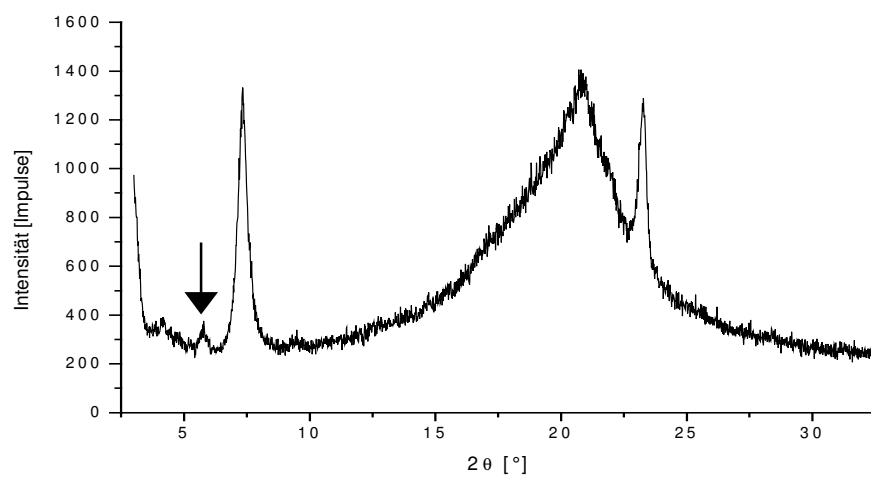
Um eine Aussage über den Einfluss des Lecithins auf die Kristallinität der Triglyceride treffen zu können, werden die Systeme mit Hilfe der Röntgenweitwinkelbeugung untersucht. Dabei wird die Periodizität kristalliner Strukturen in der Nahordnung festgestellt und damit Rückschluss auf Abstände im Kristallgitter gezogen. Abbildung 4.4 zeigt Diffraktogramme von S100 und seinen Mischungen mit Lecithin, Diffraktogramme des S142 und seinen Lecithinmischungen sind in Abbildung 4.5 dargestellt.



a)

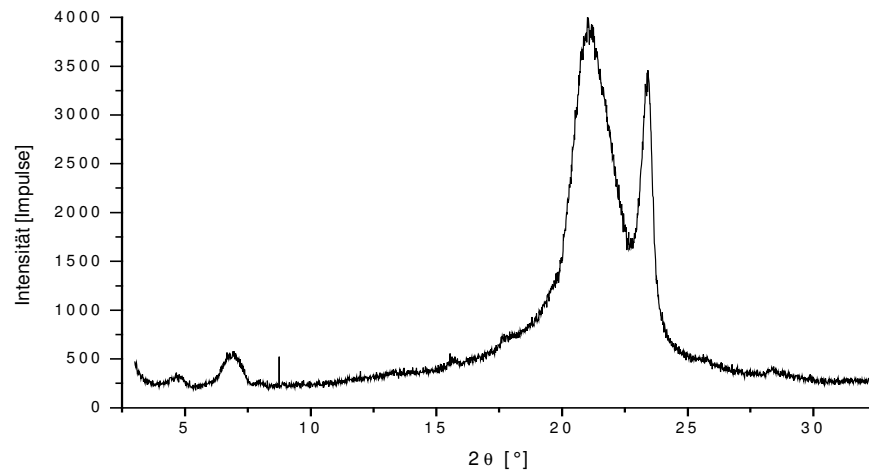


b)

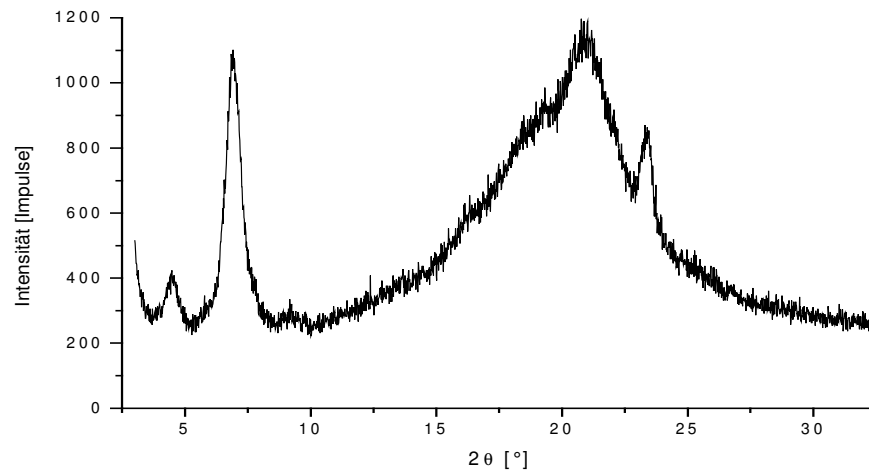


c)

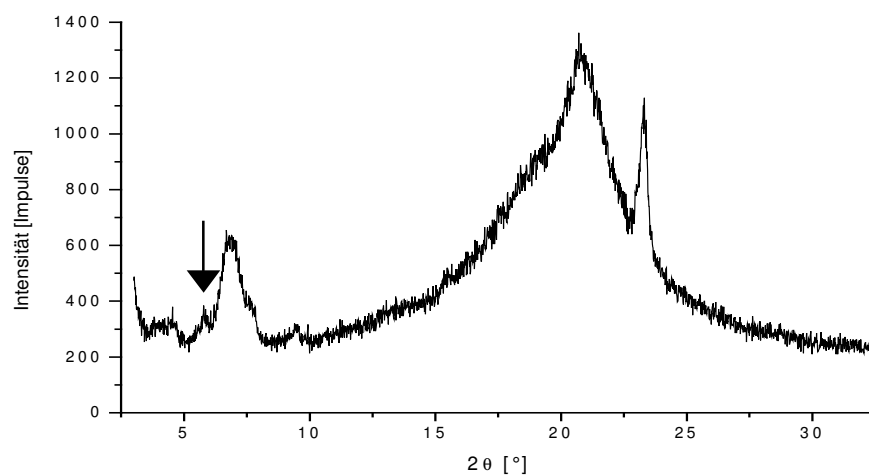
Abbildung 4.4: Röntgenweitwinkeldiffraktogramme von a) S100 b) S100 mit 50 % (m/m) Lecithin c) S100 mit 60 % (m/m) Lecithin, Pfeil siehe Text.



a)



b)



c)

Abbildung 4.5: Röntgenweitwinkeldiffraktogramme von a) S142 b) S142 mit 50 % (m/m) Lecithin c) S142 mit 60 % (m/m) Lecithin, Pfeil siehe Text.

Beide Hartfette (Abbildungen 4.4a und 4.5a) kristallisieren in einer metastabilen β' -Modifikation. Diese ist gekennzeichnet durch die typischen Röntgeninterferenzen bei $2\theta = 23,4^\circ$ und $2\theta = 21,1^\circ$, was einem Netzebenenabstand von 0,38 bzw. 0,42 nm entspricht [Larsson 1966, Hagemann 1988]. Dabei ist es irrelevant, ob die Triglyceride in die Aluminiumträger eingeschmolzen werden, nach Kaltrühren eingestrichen werden oder in flüssigem Stickstoff schockerstarren gelassen und dann eingestrichen werden.

Bis zu einer Lecithinkonzentration von 50 % (m/m) erscheinen keine zusätzlichen Interferenzen in den Diffraktogrammen (Abbildungen 4.4b und 4.5b), was auf das Vorliegen des Lecithins in röntgenamorpher und wahrscheinlich kolloidal gelöster Form hinweist. Die Intensitäten der beiden Hauptinterferenzen werden jedoch vermindert und das Diffraktogramm wird diffuser, was auf den Halo des vorwiegend flüssigkristallinen Lecithins (Abbildung 4.6) zurückzuführen ist. Die Kristallstruktur der Hartfette wird durch die Lecithininkorporation aber in beiden Fällen nicht verändert.

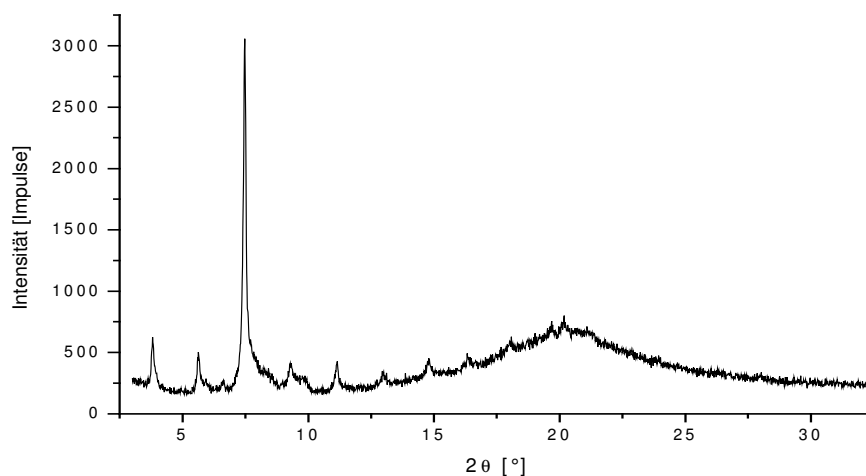


Abbildung 4.6: Röntgenweitwinkeldiffraktogramm von P90G.

Im Gegensatz zu den Proben mit bis zu 50 % (m/m) Phospholipid lässt sich nach Einbau von 60 % (m/m) Lecithin in die Lipidmasse eine typische Interferenz des Phospholipids in den Diffraktogrammen beobachten (Abbildungen 4.4c und 4.5c, Pfeile). Diese tritt bei einem Gitterabstand von 1,52-1,57 nm auf ($2\theta = 5,6-5,8^\circ$) und deutet auf eine Assoziation des Lecithins in größeren Verbänden hin.

Sowohl die Hartfette als auch das Lecithin zeigen in der Fernordnung bei kleinen Beugungswinkeln eine Interferenz bei 1,21-1,34 nm ($2\theta = 6,6-7,3^\circ$). Die Intensität

dieser Interferenz nimmt, im Verhältnis zu den beiden Hauptinterferenzen, bei den Lecithin-Hartfett-Mischungen mit zunehmendem Lecithinanteil zu. Daraus folgt, dass Lecithin in den Mischungen anteilig mit gleicher Struktur wie als Reinsubstanz vorliegt.

4.2.1.4 Untersuchung gelagerter Lecithin-Hartfett-Mischungen

Zur Identifikation möglicher Modifikationsumwandlungen werden die reinen Hartfette sowie 1:1 (m/m) Mischungen aus Lecithin und Hartfett zeitabhängig untersucht. Die Lagerung der Lipide erfolgt dabei bei einer Temperatur von 20 °C in den Aluminiumträgern, in denen die goniometrischen Untersuchungen erfolgen.

Eine metastabile, orthorhombische β' -Modifikation wandelt sich nach Thoma et al. (1983) unter Lagerung über 3-6 Monate (25 °C) oder über Jahre (20 °C) in eine stabile β -Hartfettmodifikation um. Diese Modifikationsumwandlung ist die Ursache für ein Nachhärten und die Fetteifbildung bei Suppositorien.

Eine β -Modifikation ist gekennzeichnet durch das Auftreten von typischen Röntgeninterferenzen bei $2\theta = 24,0^\circ$, $2\theta = 22,8^\circ$ und $2\theta = 19,3^\circ$, entsprechend Gitterabständen von 0,37, 0,39 und 0,46 nm [Hagemann 1988]. Diffraktogramme gelagerter Fettmassen sind in Abbildung 4.7 dargestellt. Erste Anzeichen (Pfeile) für das Auftreten einer β -Modifikation zeigen sich bei den Lecithin-Hartfett-Mischungen nach 127 Tagen Lagerung, bei den reinen Hartfetten S100 und S142 ist dies erst nach 380 bzw. 253 Tagen der Fall.

Der Zusatz von Lecithin scheint die Bildung einer stabilen Kristallmodifikation der Triglyceride zu beschleunigen. Ursache ist ein stabilisierender Effekt des Phospholipids auf die Fettmasse, was auch von Thoma und Serno (1983) beschrieben ist. Smith (2000) beobachtete, dass bereits geringe Zusätze von 0,2 % (m/m) Phosphatidylethanolamin zu einem anderen Kristallhabitus führen. Bei dem, in der vorliegenden Arbeit verwendeten, Phosphatidylcholin ist ein Einfluss auf die Kristallgröße der Triglyceride zwar vorhanden, jedoch nur schwach ausgeprägt.

Im Gegensatz zu den per WAXD beobachteten beginnenden Umwandlungen in eine β -Modifikation können diese thermoanalytisch nicht nachgewiesen werden. Tabelle 4.1 zeigt die Schmelzpeakminima der Systeme am ersten Tag nach der Kristallisation und nach drei Jahren Lagerung. Innerhalb dieser Lagerzeit kann keine eindeutige Zunahme der Schmelzpunkttemperaturen festgestellt werden, da die Anteile der höher schmelzenden, stabilen Modifikation in der Masse noch zu gering sind.

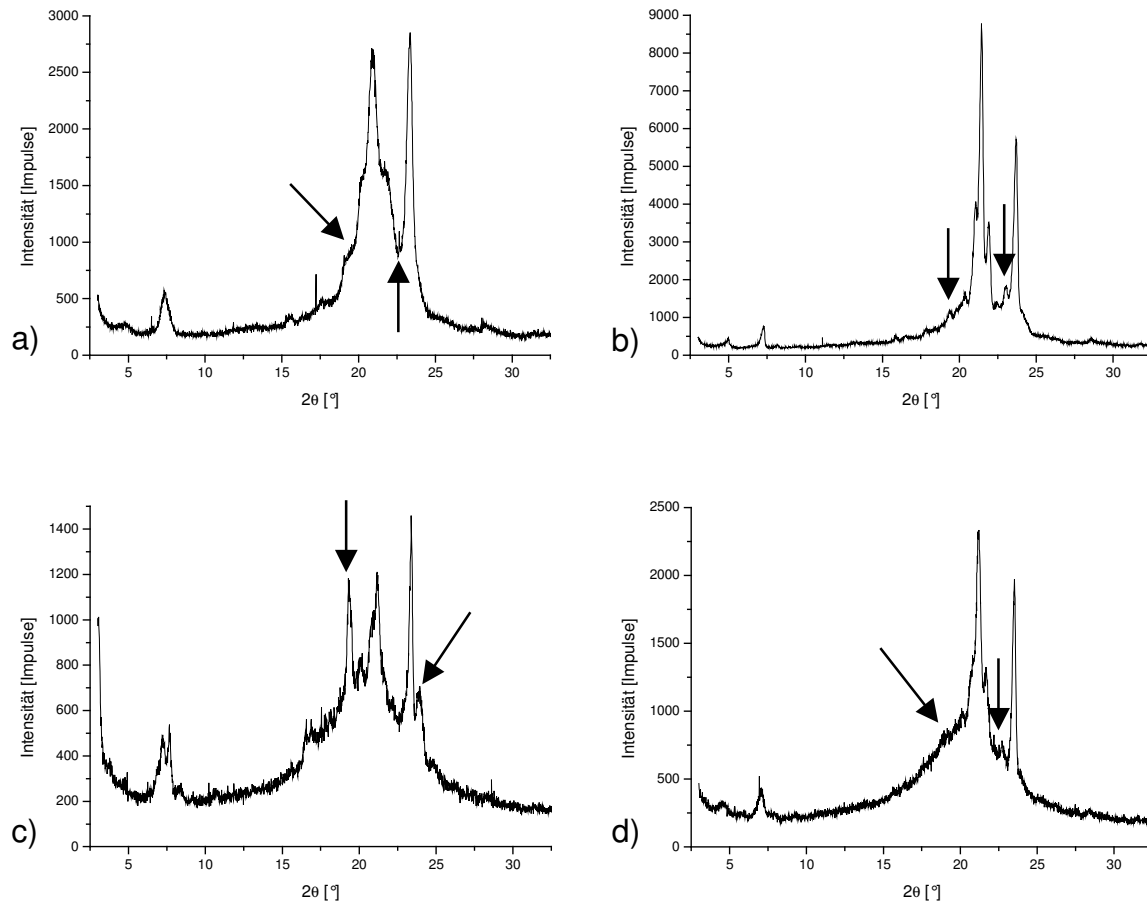


Abbildung 4.7: Röntgenweitwinkeldiffraktogramme von a) S100 (Lagerzeit 380 Tage) b) S142 (Lagerzeit 253 Tage) c) S100 mit 50 % (m/m) Lecithin (Lagerzeit 127 Tage) d) S142 mit 50 % (m/m) Lecithin (Lagerzeit 127 Tage), Pfeile siehe Text.

Tabelle 4.1: Schmelzpunkte von Lecithin-Hartfett-Mischungen nach Lagerung (n=2).

System	T _{Schm.} [°C] 1 Tag	T _{Schm.} [°C] 3 Jahre
S100	36,31 ± 0,06	35,44 ± 0,13
S100 + 50 % (m/m) Lecithin	37,13 ± 0,08	38,40 ± 0,12
S142	43,60 ± 0,06	43,64 ± 0,37
S142 + 50 % (m/m) Lecithin	44,16 ± 1,17	44,42 ± 0,26

4.2.1.5 Polarisationsmikroskopische Untersuchungen von Lecithin-Hartfett-Mischungen

Zur weiteren Charakterisierung der kristallinen Proben bzw. der Schmelzen werden die reinen Hartfette S100 und S142 sowie ihre 50 %igen (m/m) Mischungen mit Lecithin polarisationsmikroskopisch untersucht. Abbildung 4.8 zeigt Aufnahmen der erstarrten Systeme.

Alle untersuchten Präparate zeigen ein anisotropes Bild mit dichter Textur, die durch die kristallinen Hartfette hervorgerufen wird. Dabei können keine eindeutigen Unterschiede festgestellt werden, tendenziell neigen jedoch die lecithinhaltigen Systeme dazu, gröber auszukristallisieren (Abbildung 4.8c vs. 4.8a), was auch von Smith (2000) festgestellt wurde (vgl. Abschnitt 4.2.1.4). Nach Aufheizen der Objektträger über den Schmelzpunkt der Systeme kann eine Wandlung in ein isotropes Bild verfolgt werden.

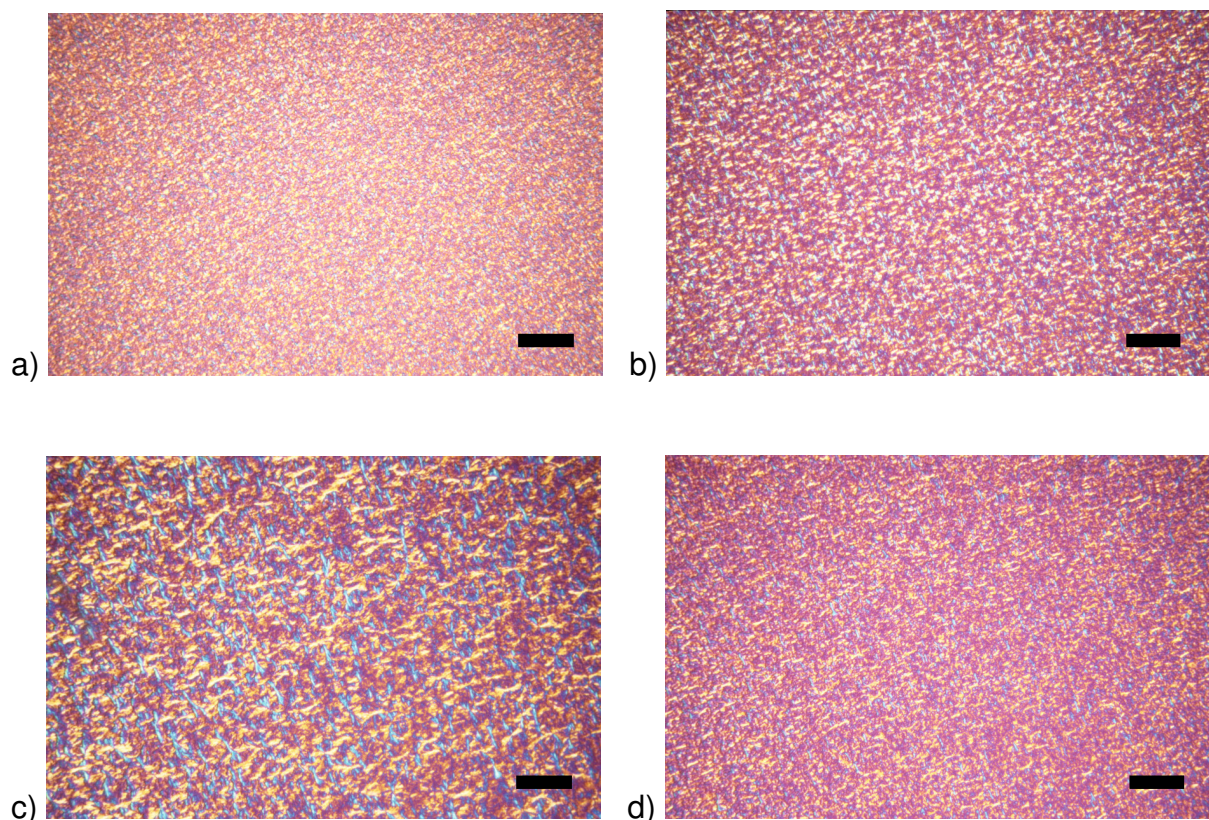


Abbildung 4.8: Polarisationsmikroskopische Aufnahmen (Alle: 3 h nach Erstarren, Balken = 100 μm) von a) S100 b) S142 c) S100 mit 50 % (m/m) Lecithin d) S142 mit 50 % (m/m) Lecithin.

In Einzelfällen können bei lecithinhaltigen Lipiden, die sehr schnell auf dem Objektträger erstarren gelassen werden, flächige Farbeindrücke beobachtet werden (Abbildung 4.9). Diese wölckchenartigen Texturen deuten auf das Vorliegen von hexagonalen Flüssigkristallen hin [Rosevear 1954, Saupe 1977], was den Rückschluss erlaubt, dass Lecithin zumindest partiell als Assoziat von Röhren bzw. lang gestreckten Stäbchenmizellen vorliegt. Diese Texturen können bei den reinen Hartfetten nicht gefunden werden.

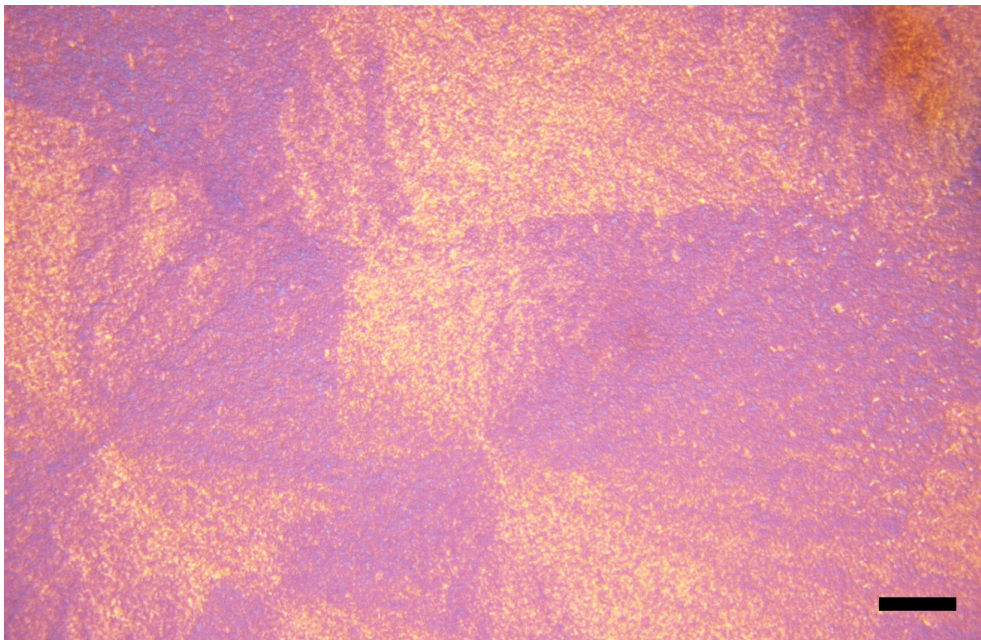


Abbildung 4.9: Polarisationsmikroskopische Aufnahme von S100 mit 50 % (m/m) Lecithin, erstarnt auf dem Objektträger (Balken = 100 µm).

Um die Wechselwirkungen der Lipide mit Wasser zu untersuchen, werden Kontaktpräparate hergestellt. Abbildung 4.10 zeigt beispielhaft das Verhalten von S142 bei Kontakt mit Wasser, Abbildung 4.11 jenes einer S100-Lecithin-Mischung.

Im erstarrten Zustand (Abbildungen 4.10a und 4.11a) sind die Kontaktflächen im Wesentlichen indifferent, d.h. eine Quellung bzw. die Bildung flüssigkristalliner Bereiche bei den lecithinhaltigen Proben durch Transformation von Assoziaten des Phospholipids, wie von Hamann (1990) und Papantoniou (1995) für flüssige Systeme beschrieben, kann nicht festgestellt werden.

Nach Aufschmelzen der Lipide zeigt sich bei den reinen Hartfetten ein isotropes Bild (Abbildung 4.10b). Bei den lecithinhaltigen Proben kann jedoch an der Grenzfläche die Ausbildung einer lamellaren Mesophase beobachtet werden (Abbildung 4.11b). Ein lamellarer Flüssigkristall ist gekennzeichnet durch typische Texturen wie Malteserkreuze, die einzeln oder im kettenartigen Verband als so genannte „oily

serkreuze, die einzeln oder im kettenartigen Verband als so genannte „oily streaks“, d.h. streifenförmige, stark doppelbrechende Texturen, auftreten (Saupe 1977). Diese lamellare Mesophase wächst, ausgehend von der Grenzfläche mit Wasser in zwei Richtungen, und zwar durch Diffusion von Wasser in das geschmolzene Lipidgemisch hinein und andererseits durch Diffusion von Lecithinmolekülen in die Wasserphase.

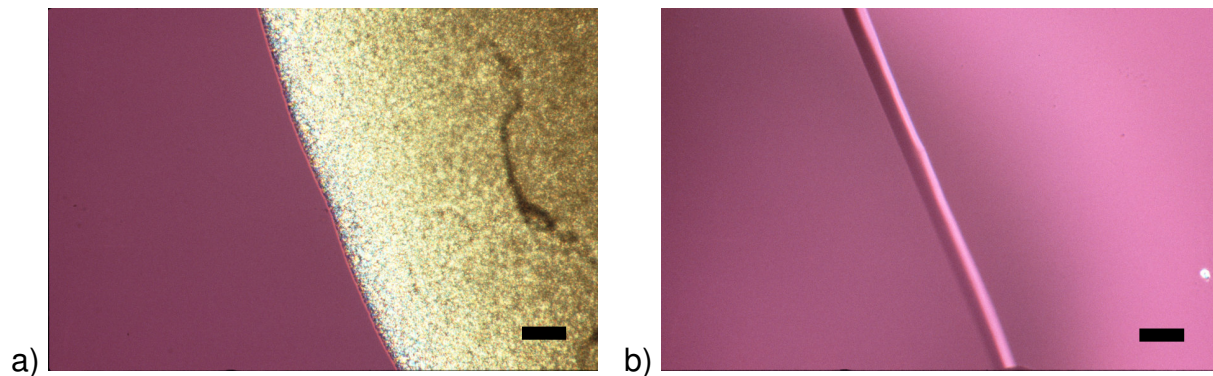


Abbildung 4.10: Kontaktpräparat von S142 mit Wasser bei a) 25 °C b) 50 °C (Beide: Balken = 100 μm).

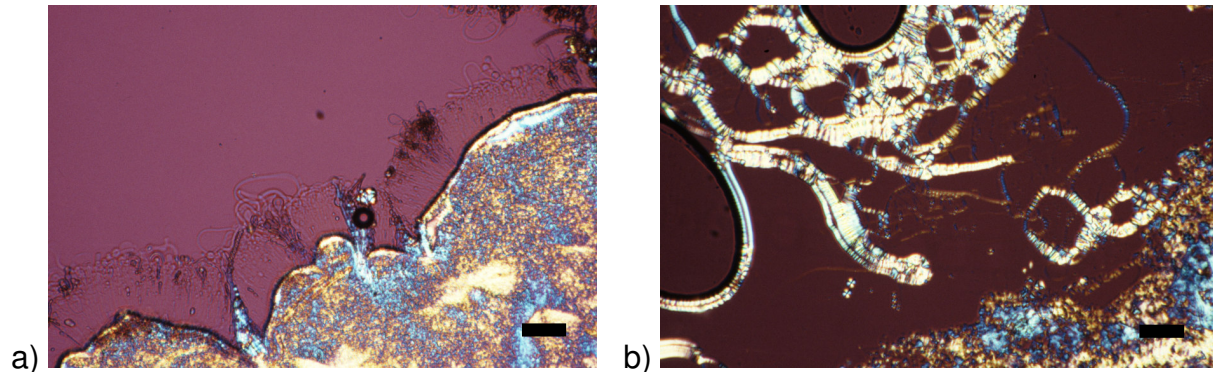


Abbildung 4.11: Kontaktpräparat von S100/Lecithin (1:1 (m/m)) mit Wasser bei a) 25 °C b) 40 °C (Beide: Balken = 100 μm).

4.2.1.6 Elektronenmikroskopische Untersuchungen von Lecithin-Hartfett-Mischungen

Mit Hilfe der Transmissionselektronenmikroskopie können die innere Struktur eines Systems visualisiert und somit Rückschlüsse gezogen werden, welchen Einfluss Lecithin auf die Triglyceridstruktur hat und wie Lecithin eingebaut wird. Durch Schockerstarrung bleibt die kolloidale Struktur der Systeme erhalten, die dann repliziert und im TEM sichtbar gemacht werden kann.

Untersucht werden wiederum die reinen Hartfette sowie deren 1:1 (m/m) Mischungen mit Lecithin. Abbildung 4.12 zeigt typische Bilder der lecithinfreien Lipide, auf denen planare, terrassenförmig geschichtete Flächen zu beobachten sind. Diese Strukturen sind auf das Kristallgitter der Triglyceride zurückzuführen.

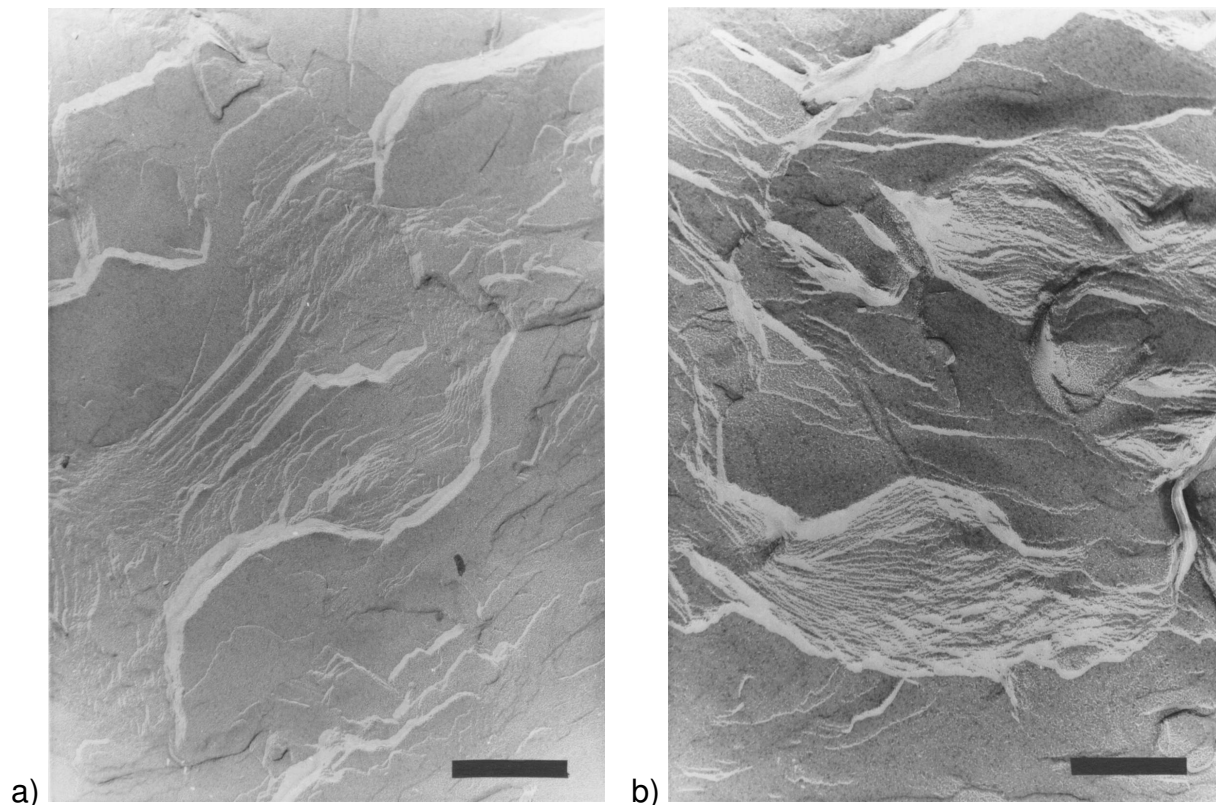


Abbildung 4.12: Typische Strukturen von a) S100 (Balken = 303 nm) b) S142 (Balken = 238 nm).

Die beschriebenen glatten Flächen sind auch bei den Replika der lecithinhaltigen Systeme vorhanden (Abbildungen 4.13a und 4.14a). Im Gegensatz zu den reinen Hartfetten sind aber ausschließlich bei diesen Mischungen zwischen den geschichteten Flächen Bereiche zu finden, die sphärische Assoziate mit einem Durchmesser von 10-20 nm enthalten (Abbildungen 4.13b und 4.14b). Dieser Befund deutet auf die Existenz von inversen Mizellen auch im festen Zustand hin, d.h. dass Assoziate, die in der flüssigen Schmelze vorliegen, auch im festen Zustand konserviert bleiben. Diese Bereiche nehmen jedoch nicht eine, der Lecithinkonzentration von 50 % (m/m), entsprechende, sondern eine geringere Fläche ein. Daher sind andere Arten der Lecithininkorporation sehr wahrscheinlich. Dies könnte eine Assoziation in Lamellen oder die Lokalisation der Phospholipide zwischen den Triglyceridmolekülen sein.

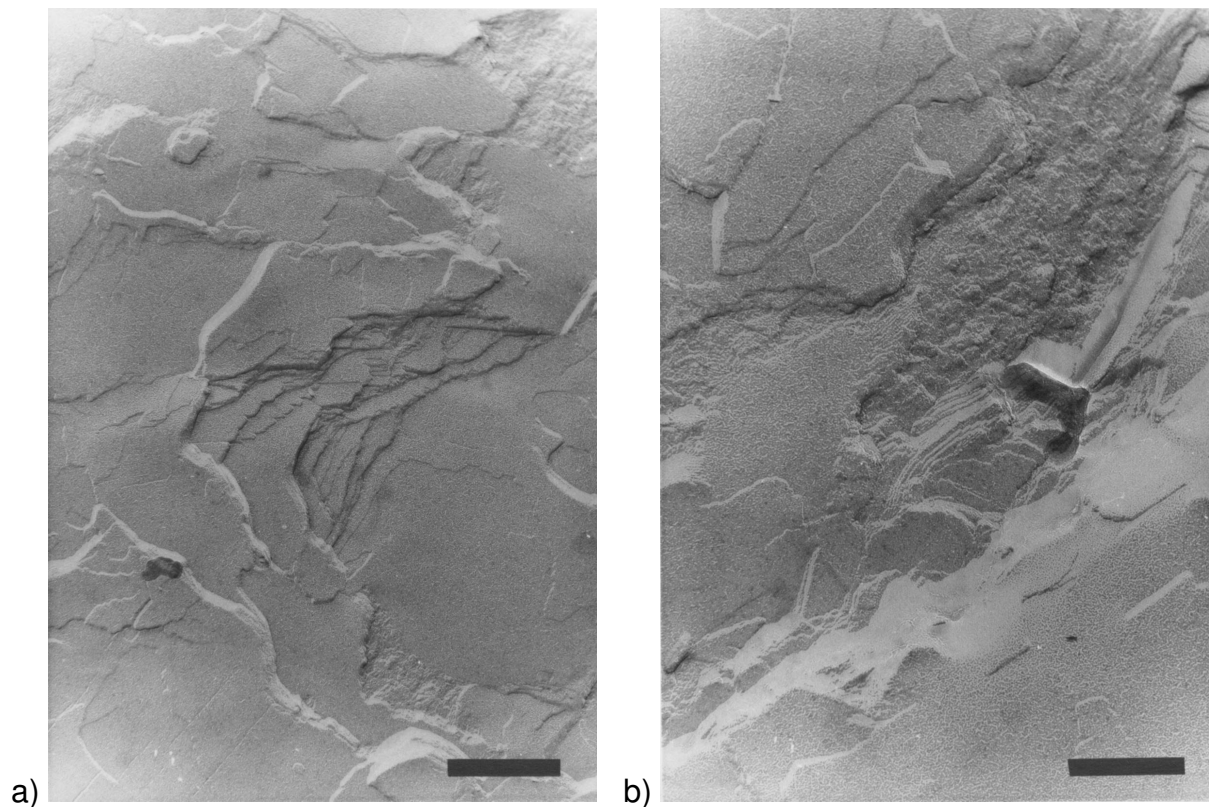


Abbildung 4.13: Typische Strukturen von S100 mit 50 % (m/m) Lecithin. a) Balken = 303 nm b) Balken = 182 nm.

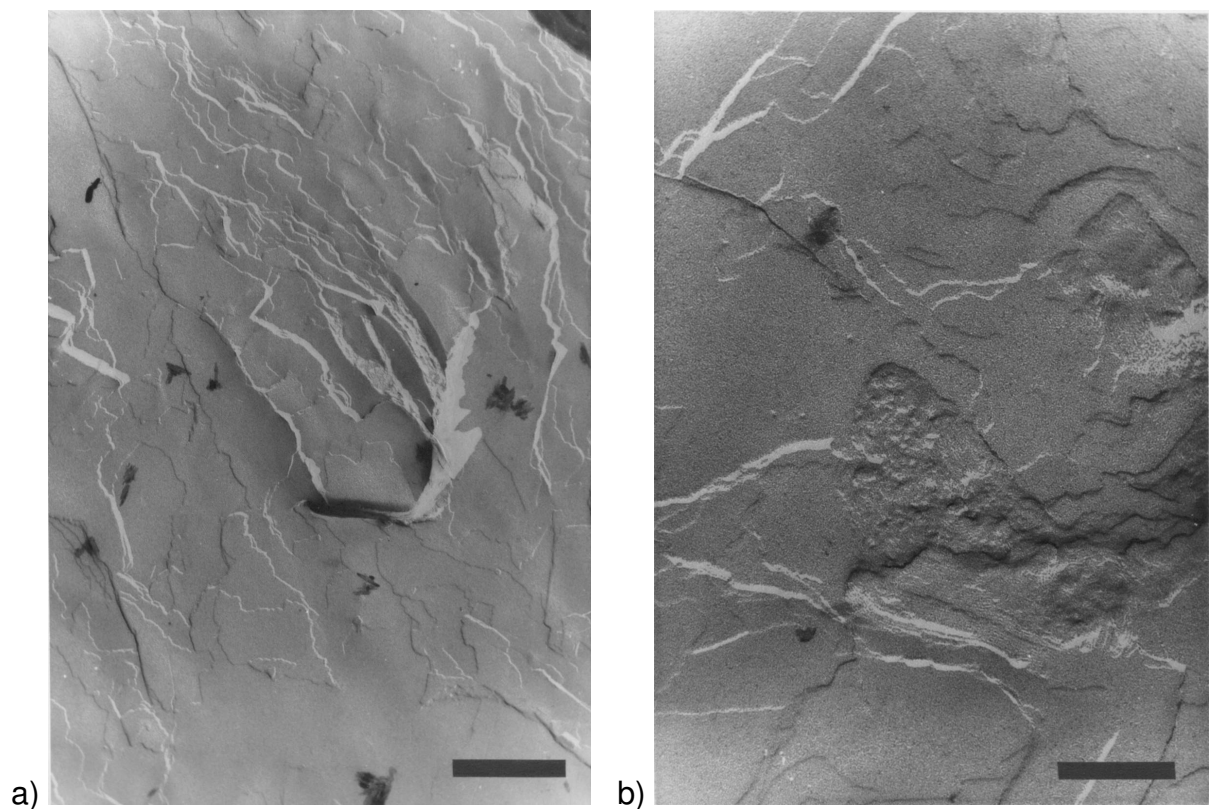


Abbildung 4.14: Typische Strukturen von S142 mit 50 % (m/m) Lecithin. a) Balken = 370 nm b) Balken = 143 nm.

In einem lecithinhaltigen Präparat, das in flüssigem Stickstoff erstarren gelassen wird, können zylinderartige Strukturen gefunden werden, die wiederum auf eine hexagonale Mesophase hindeuten (Abbildung 4.15). Dies würde die, in Abschnitt 4.2.1.5 beschriebenen, Beobachtungen bestätigen, dass ein schnelles Erstarren der lecithinhaltigen Mischungen lang gestreckte Stäbchenmizellen zumindest als Übergangsstruktur erzeugt. Diese Strukturen können wiederum bei reinen Hartfetten nicht gefunden werden.

Die Bildung sogenannter „worm-like micelles“ bzw. „inverser Spaghettimizellen“ wird von Mackeben et al. (2001) als Übergangsstruktur zwischen kleineren inversen Mizellen und der lamellaren Mesophase beschrieben. Diese Strukturen entstehen jedoch durch Hydratation der polaren Lecithinkopfgruppe unter Änderung des Packungsparameters des Amphiphils, was im vorliegenden Fall ausgeschlossen werden kann, da es sich um wasserfreie Systeme handelt.

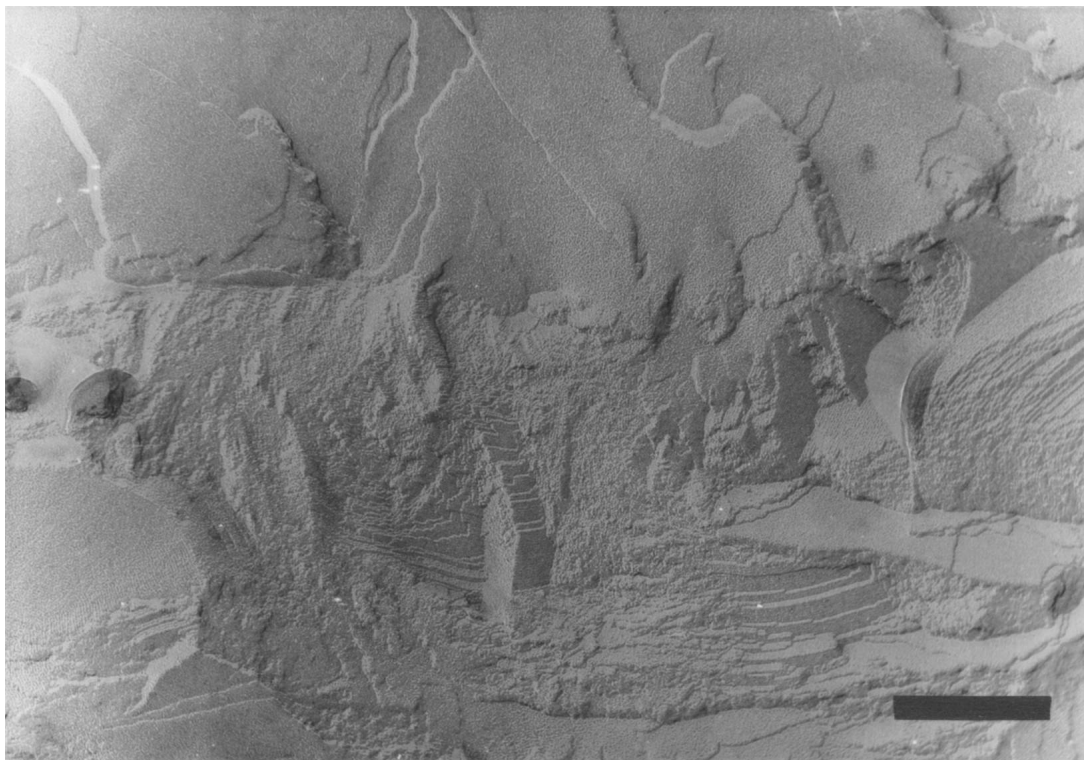


Abbildung 4.15: Elektronenmikroskopische Aufnahme von S142 mit 50 % (m/m) Lecithin (Balken = 238 nm).

4.2.1.7 Partikelgrößenbestimmung in Lecithin-Hartfett-Mischungen mittels Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS)

Die Partikelgröße von Assoziaten in der Schmelze der Systeme wird mit Hilfe der PCS bestimmt. Dabei können in der Schmelze der reinen Hartfette keine Partikel nachgewiesen werden, die lecithinhaltigen Schmelzen mit 50 % (m/m) Phospholipid enthalten hingegen Assoziate von $12,3 \pm 3,2$ nm (S100/P90G) bzw. $11,1 \pm 3,5$ nm (S142/P90G) Durchmesser ($n=6$), was für das Vorliegen inverser Mizellen spricht.

Lecithin, das im öligen Medium Isopropylmyristat ($\eta=5$ mPas bei 20 °C) gelöst wird, bildet inverse Mizellen von ca. 10-15 nm Größe [Papantoniou und Müller-Goymann 1995a, Schneeweis 1999, Mackeben und Müller-Goymann 2000], während in mittelkettigen Triglyceriden höherer Viskosität ($\eta=30$ mPas bei 20 °C) Assoziate von 6 nm Durchmesser zu finden sind [Friedrich et al. 2000]. Die Viskosität der geschmolzenen Hartfette beträgt bei der Messtemperatur von 50 °C 21,4 (S100) bzw. 26,0 mPas (S142) und liegt somit zwischen den Viskositäten der beschriebenen flüssigen Lipide.

4.2.2 Charakterisierung arzneistoffhaltiger Lecithin-Hartfett-Mischungen

4.2.2.1 Herstellung

Zur Inkorporation der Arzneistoffe in die Lecithin-Hartfett-Mischungen werden diese, im Falle von Estradiol, Hydrocortison und Pilocarpin-Base, direkt in der Schmelze gelöst. Pilocarpin-HCl, das eine hohe Wasserlöslichkeit von 1:0,3 aufweist [Pharmazeutische Stoffliste 2003] und somit der hydrophilste der Arzneistoffe ist, wird über den Umweg eines lamellaren Flüssigkristalls solubilisiert. Das Wasser der Arzneistofflösung, das für die Transformation der invers mizellaren Schmelze in den Flüssigkristall verantwortlich ist, wird verdunstet gelassen und das Pilocarpin-HCl verbleibt in den Assoziaten.

4.2.2.2 Solubilisationsversuche

Zur Abschätzung des Arzneistoffträgerpotentials der Lecithin-Hartfett-Mischungen wird die, in der Schmelze maximal solubilisierbare, Arzneistoffkonzentration bei 60 °C in Abhängigkeit von der Lecithinkonzentration durch makroskopische Beurteilung bestimmt (vgl. Abschnitt 3.2.2). Abbildung 4.16 zeigt die Ergebnisse für S100-haltige Mischungen.

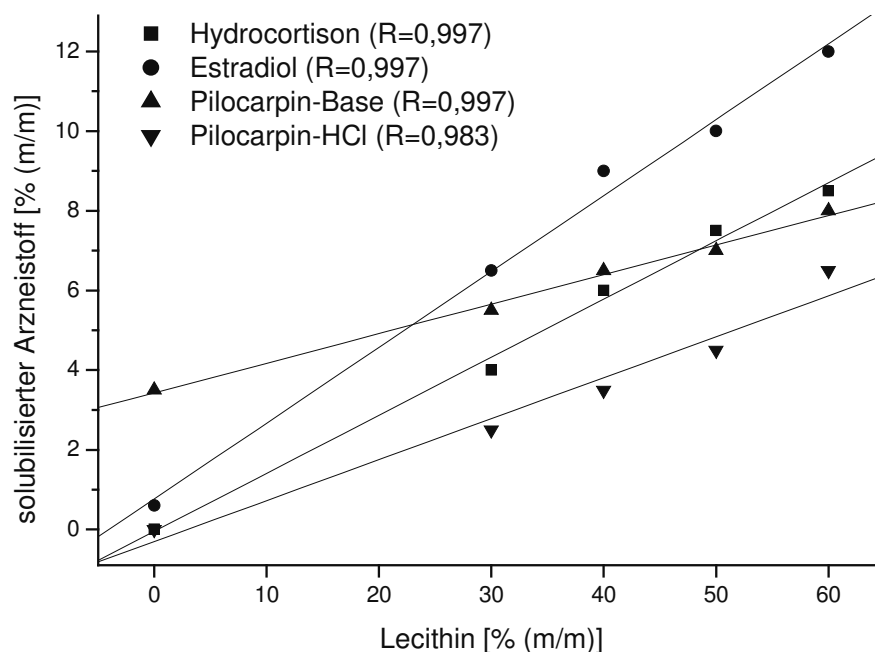


Abbildung 4.16: Makroskopisch solubilisierbare Arzneistoffkonzentrationen in S100/P90G-Mischungen bei 60 °C.

Die Löslichkeit aller Arzneistoffe in der Schmelze wird linear mit steigendem Lecithingehalt erhöht. Dabei kommt es insbesondere bei dem, in Wasser und Ölen schwer löslichen, Hydrocortison und dem, in Wasser schwer und in Ölen schlecht löslichen, Estradiol [Pharmazeutische Stoffliste 2003] zu enormen Steigerungen. Die Löslichkeit von Hydrocortison wird von nahezu 0 auf 7,5 % (m/m), die von Estradiol von 0,6 auf 10 % (m/m) gesteigert (jeweils 0 vs. 50 % (m/m) Lecithin).

Die drastische Steigerung der solubilisierten Arzneistoffmengen in den Systemen erlaubt die Annahme, dass die Arzneistoffe mit Assoziaten des Lecithins, d.h. inversen Mizellen, interagieren. Wie von Papantoniou und Müller-Goymann (1995a) sowie Friedrich et al. (2000) beschrieben, können Arzneistoffe entsprechend ihrer physikochemischen Eigenschaften auf verschiedene Art in inverse Mizellen eingebaut werden.

Für S142-haltige Mischungen werden die Löslichkeiten lediglich bestätigend für eine 1:1 (m/m) Mischung aus Hartfett und Lecithin bestimmt. Tabelle 4.2 fasst die maximal solubilisierbaren Arzneistoffmengen in den 50 %igen (m/m) Systemen zusammen.

Tabelle 4.2: Solubilisierbare Arzneistoffkonzentrationen [% (m/m)] in den Systemen.

Arzneistoff	S100/P90G 1:1 (m/m)	S142/P90G 1:1 (m/m)
Pilocarpin-HCl	4,5	4,5
Pilocarpin-Base	7,0	6,5
Hydrocortison	7,5	7,0
Estradiol	10,0	8,5

Die solubilisierbare Menge der Arzneistoffe im S142-haltigen System ist, mit Ausnahme von Pilocarpin-HCl, in allen Fällen niedriger als in den S100-haltigen Mischungen. Die mittlere Assoziatgröße dieses S142-Systems ist leicht erniedrigt und weniger Arzneistoff kann entsprechend in die Mizellen inkorporiert werden. Die kleineren Assoziat sind dabei im Zusammenhang mit der höheren Viskosität der Schmelze von S142 und der S142-haltigen Systeme zu sehen (vgl. Abschnitt 4.2.1.7). Diese Beeinflussung des Durchmessers inverser Mizellen durch die Viskosität des lipophilen Mediums ist bereits von Friedrich et al. (2000) beschrieben worden.

4.2.2.3 DSC-Untersuchungen estradiolhaltiger Systeme

Estradiolhaltige Mischungen von Lecithin und Hartfett (1:1 (m/m)) werden thermoanalytisch untersucht, um ein mögliches Ausfällen des Arzneistoffs in größeren Kristallen während der Abkühlung der Lipidschmelzen abzuklären. Das reine Estradiol weist einen Schmelzvorgang bei einer Temperatur von 175 °C auf (Abbildung 4.17).

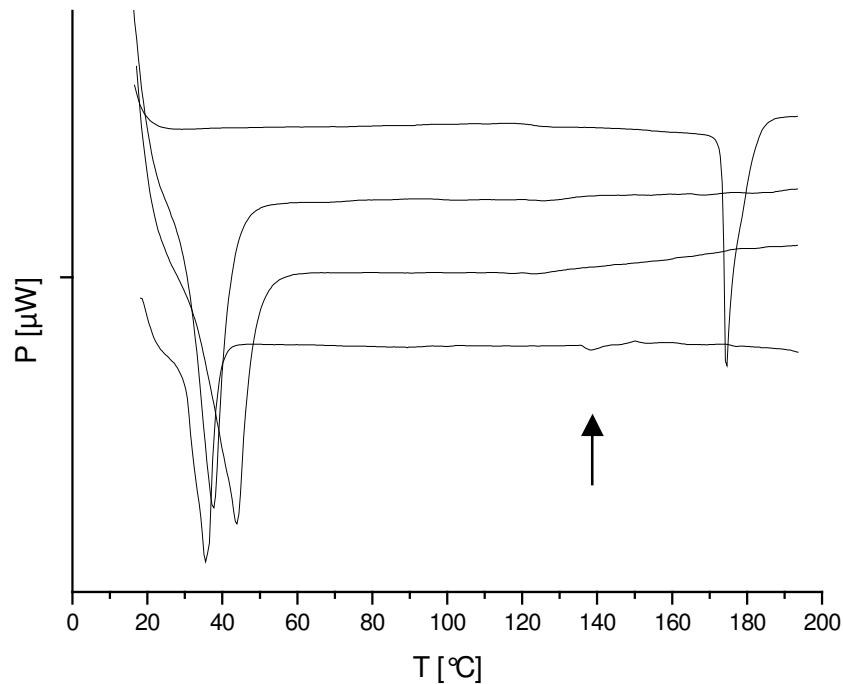


Abbildung 4.17: DSC-Thermogramme von EST sowie 8,0 % (m/m) EST in S100/P90G 1:1 (m/m), in S142/P90G 1:1 (m/m) und in S100/P90G 1:1 (m/m) als physikalische Mischung (von oben nach unten, Pfeil siehe Text).

Bei Einarbeitung von 8,0 % (m/m) Estradiol in die Lipidschmelze ist nach Rekristallisation der Hartfette neben dem Schmelzen der Triglyceride kein zusätzlicher Schmelzpeak zu erkennen. Auch bezüglich der Schmelzenthalpie kann keine Störung des Kristallgitters der Hartfette durch den Arzneistoff festgestellt werden. Das Fehlen eines Schmelzpeaks von Estradiol weist auf ausschließlich solubilisiertes Estradiol hin, das entweder in inversen Mizellen lokalisiert oder molekulardispers in den Triglyceriden verteilt vorliegt. Bei einer physikalischen Mischung der gleichen Estradiolmenge mit einer Mischung von Lecithin und S100 (1:1 (m/m)) lässt sich ein Schmelzvorgang bei etwa 140 $^{\circ}\text{C}$ detektieren (Pfeil). Während des Aufheizvorgangs

löst sich kristallines Estradiol in der Schmelze der Lipide auf, weshalb kein scharfer Schmelzübergang bei 175 °C, dem Schmelzpunkt des reinen Estradiols, erhalten werden kann.

4.2.2.4 Röntgenuntersuchungen (WAXD) estradiolhaltiger Systeme

Um weitere Informationen über das Kristallisationsverhalten von Estradiol in den Lecithin-Hartfett-Mischungen zu erhalten, werden diese Systeme wiederum per Röntgenweitwinkelbeugung untersucht. Abbildung 4.18a ist zu entnehmen, dass die Reinsubstanz Estradiol ausgeprägte Interferenzen zeigt. Werden 9,5 % (m/m) Estradiol in S100 suspendiert, so lassen sich, dem Arzneistoff zuzuordnende, Interferenzen bei $2\theta = 13,4^\circ$, $2\theta = 16,0^\circ$ und $2\theta = 18,5^\circ$ finden (siehe Pfeile), die von nicht gelöstem, kristallinem Estradiol stammen (Abbildung 4.18b).

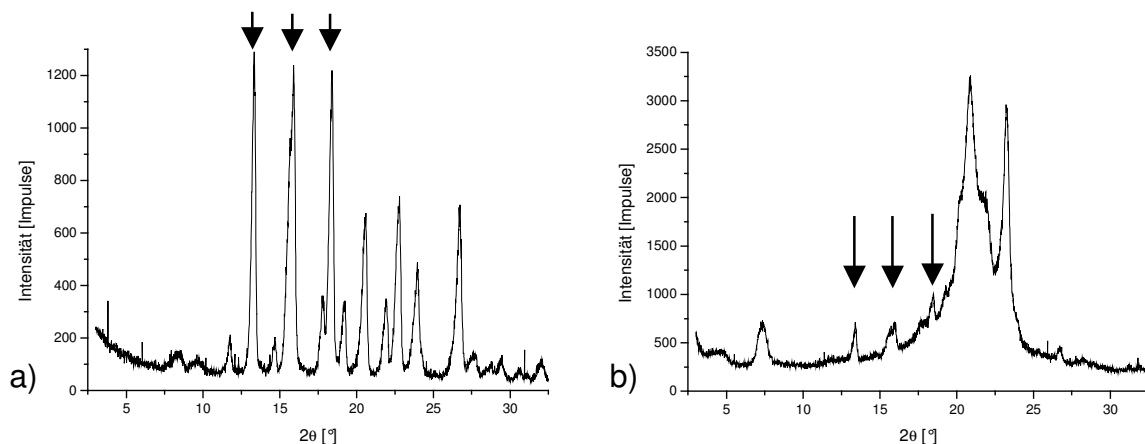


Abbildung 4.18: Röntgenweitwinkeldiffraktogramme von a) EST b) 9,5 % (m/m) EST in S100, Pfeile siehe Text.

Die gleiche Arzneistoffmenge erzeugt keine zusätzlichen Interferenzen, wenn sie in einer Mischung aus Lecithin und S100 (1:1 (m/m)) solubilisiert wird (Abbildung 4.19a). Es kann lediglich ein kleines Plateau bei etwa $2\theta = 12,0^\circ$ beobachtet werden, sodass im Wesentlichen von molekulardispers verteiltem oder in Assoziaten solubiliertem Arzneistoff ausgegangen werden kann. Aus Abbildung 4.19b ist ersichtlich, dass dieses Plateau bei Erhöhung der Estradiolkonzentration auf 11,0 % (m/m) ausgeprägter hervortritt und eine Interferenz bei $2\theta = 20,0^\circ$ erscheint (Pfeil). Diese Arzneistoffmenge kann in der Schmelze nicht komplett solubilisiert werden, wie die makroskopische Beurteilung zeigt (vgl. Abschnitt 4.2.2.2). Werden 14,0 % (m/m)

Estradiol hinzugefügt, so geht das Plateau allmählich in einen diskreten Peak bei $2\theta = 11,7^\circ$ über, bei $2\theta = 15,7^\circ$ erscheint eine Schulter und die Interferenz bei $2\theta = 19-20^\circ$ erscheint als scharfer Peak (Abbildung 4.19c, Pfeile). In den letzten beiden Fällen liegt das Estradiol in der Lipidmasse zumindest in größeren Anteilen kristallin vor und kann in der festen Masse nicht mehr komplett solubilisiert werden. Hier kann also nicht mehr von einer festen Lösung ausgegangen werden. Dabei könnte das Estradiol in einer anderen Modifikation kristallisieren, da es, im Vergleich zur Reinsubstanz, zu Abweichungen bezüglich der Lage der Interferenzen kommt. Dies kann andererseits auch auf die Unschärfe der Diffraktogramme der lecithinhaltigen Systeme zurückzuführen sein.

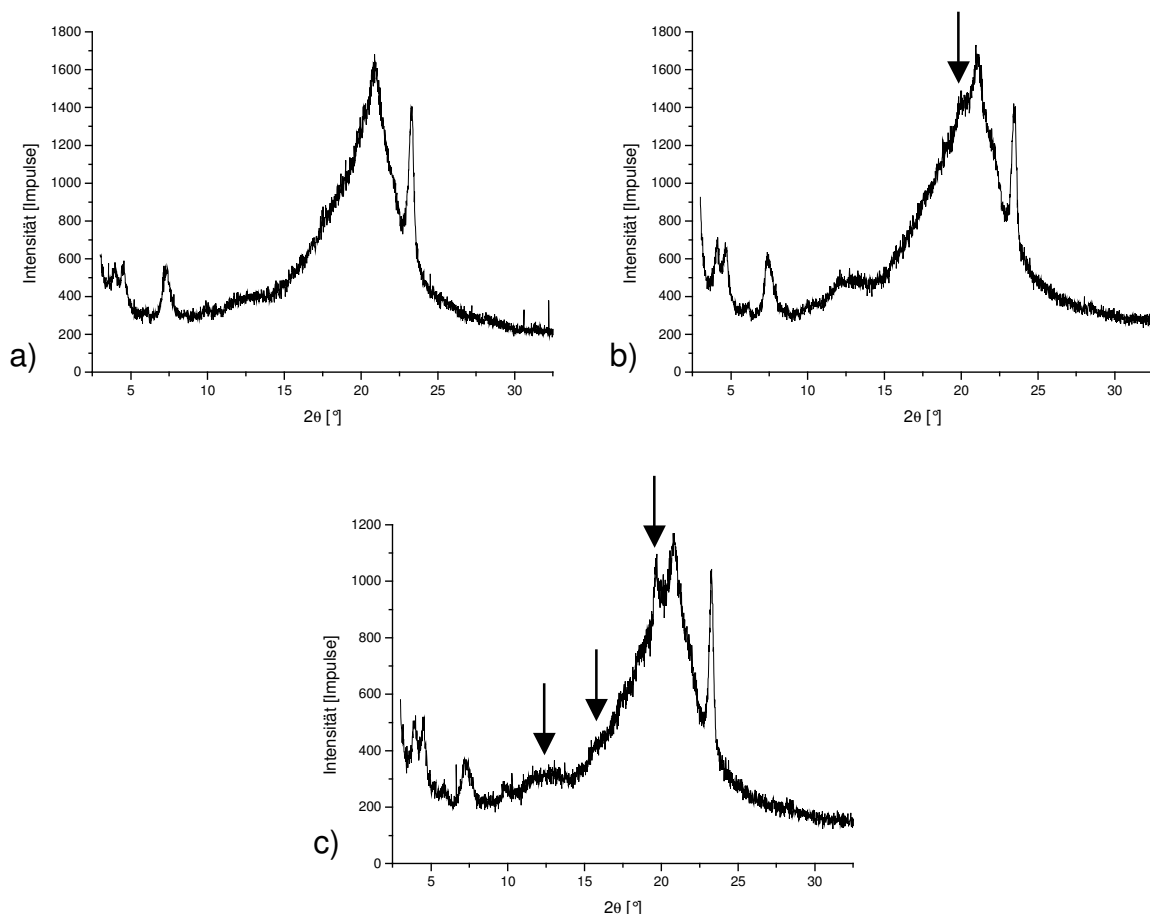


Abbildung 4.19: Röntgenweitwinkeldiffraktogramme von S100/P90G 1:1 (m/m) unter Zusatz von a) 9,5 % (m/m) EST b) 11,0 % (m/m) EST c) 14,0 % (m/m) EST.

Die S142-haltigen Systeme zeigen ein entsprechendes Ergebnis bei Inkorporation von 8,0, 11,0 und 12,5 % (m/m) Estradiol. Die erstgenannte Konzentration kann in der Schmelze noch solubilisiert werden (vgl. Abschnitt 4.2.2.2), die höheren Konzentrationen erzeugen ein Plateau bzw. zusätzliche Interferenzen aufgrund auskristallisierten Arzneistoffs.

4.2.2.5 Mikroskopische Untersuchungen pilocarpinhaltiger Systeme

Da Pilocarpin-Base bei Raumtemperatur als viskose, „ölige“ Flüssigkeit vorliegt und entsprechend keine kristallographischen Untersuchungen ermöglicht, wird das Solubilitätsverhalten dieses Arzneistoffs mikroskopisch untersucht.

Werden die erstarrten, pilocarpinhaltigen Lecithin-Hartfett-Mischungen unter dem Mikroskop mit einer konstanten Heizrate von 10 °C/min aufgeheizt, so sind sie bei einer Temperatur von 37-38 °C (P90G/S100 1:1 (m/m)) bzw. 45-46 °C (P90G/S142 1:1 (m/m)) vollständig geschmolzen. Der Schmelzpunkt wird durch das Verschwinden anisotroper Strukturen identifiziert. Oberhalb dieser Temperatur können jedoch noch isotrope Tröpfchen beobachtet werden, die von der nicht gelösten Pilocarpin-Base stammen. Die Temperatur, bei der diese Tropfen bei weiterem Aufheizen mikroskopisch nicht mehr beobachtet werden können, wird als Lösungstemperatur bestimmt. Beim Abkühlen der einphasigen Schmelze erscheinen diese Tröpfchen erneut. Die entsprechende Temperatur wird ebenfalls bestimmt und als Sättigungstemperatur bezeichnet. In Abbildung 4.20 sind die Lösungs- und die Sättigungstemperaturen für Pilocarpin-Base in den 50 %igen (m/m) Lecithin-Hartfett-Mischungen bei verschiedenen Arzneistoffkonzentrationen dargestellt.

In den S100-haltigen Systemen ist, wie auch schon makroskopisch zu beobachten ist (vgl. Abschnitt 4.2.2.2), bei gleicher Temperatur eine größere Arzneistoffmenge in Lösung zu bringen als bei den S142-haltigen Systemen. Bei gleicher Arzneistoffkonzentration wird die Lösung bei niedrigeren Temperaturen erreicht als bei Systemen mit S142. Ebenso findet die Sättigung bei dem S100-haltigen System, d.h. das erneute Auftreten der Tröpfchen durch Phasentrennung, bei niedrigeren Temperaturen statt.

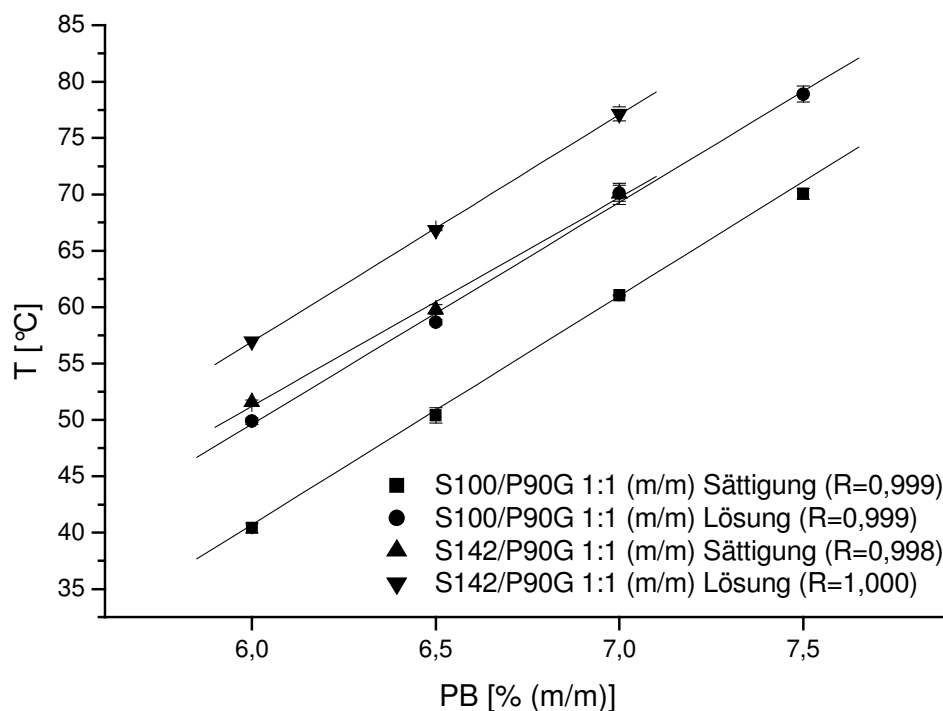


Abbildung 4.20: Lösungs- und Sättigungstemperatur von PB in Abhängigkeit von der Arzneistoffkonzentration (n=2).

Die lineare Regression der Sättigungstemperaturen führt zu folgenden Geradengleichungen:

$$\text{S100/P90G 1:1 (m/m), Sättigung:} \quad y = 20,29 \cdot x - 81,02 \quad (\text{Gl. 4.3})$$

$$\text{S142/P90G 1:1 (m/m), Sättigung:} \quad y = 18,50 \cdot x - 59,78 \quad (\text{Gl. 4.4})$$

Die Extrapolation dieser Geraden auf eine Raumtemperatur (y) von 20 °C ergibt für das S100-haltige System eine Pilocarpinsättigungskonzentration (x) von 5,0 % (m/m), für die S142-haltige Lipidmasse eine Sättigungskonzentration von 4,3 % (m/m) Pilocarpin-Base.

Geht man davon aus, dass es auch im festen Zustand noch zu Entmischungen kommen kann, so müssen die Lösungstemperaturen betrachtet werden:

$$\text{S100/P90G 1:1 (m/m), Lösung:} \quad y = 19,69 \cdot x - 68,52 \quad (\text{Gl. 4.5})$$

$$\text{S142/P90G 1:1 (m/m), Lösung:} \quad y = 20,15 \cdot x - 63,98 \quad (\text{Gl. 4.6})$$

Bei diesen Temperaturen ergibt eine Extrapolation auf 20 °C (y) gelöste Pilocarpinkonzentrationen (x) von 4,5 % (m/m) (S100/P90G 1:1 (m/m)) bzw. 4,2 % (m/m) (S142/P90G 1:1 (m/m)).

4.2.3 Zusammenfassende Diskussion der Ergebnisse der physikochemischen Charakterisierung von Lecithin-Hartfett-Mischungen

Durch verschiedene Charakterisierungsmethoden, wie die Dynamische Differenzkalorimetrie und die Röntgenweitwinkeldiffraktometrie, kann gezeigt werden, dass nach Inkorporation von Lecithin in die Hartfette die physikochemischen Eigenschaften beider Mischungspartner erhalten bleiben.

Der Schmelzpunkt und die Kristallmodifikation der Hartfette sind zumindest bis zu einer Konzentration von 50 % (m/m) Phospholipid unverändert. Die Schmelzpunkte der Lecithin-Hartfett-Mischungen sind die gleichen wie die der reinen Hartfette S100 bzw. S142, wobei das Phospholipid die Rekristallisation von etwa 10 % der Triglyceride zu verhindern scheint. Die Kristallmodifikation bleibt davon jedoch zunächst unberührt, d.h. auch in Gegenwart von Lecithin erfolgt die Rekristallisation in der metastabilen, orthorhombischen β' -Form. Andererseits kann beobachtet werden, dass ein Lecithinzusatz von 60 % (m/m) eine deutliche Assoziation des Amphiphils in größeren Verbänden hervorruft. Dies könnten unter anderem lamellenartige Strukturen sein. Bei Lagerung der Systeme kommt es in Gegenwart des Phospholipids zu einer beschleunigten Modifikationsänderung der Hartfette in die stabile, triklinische β -Form. Lecithin hat insofern einen „stabilisierenden“ Einfluss auf die Triglyceride.

In der Schmelze der Lecithin-Hartfett-Mischungen können Assoziate von etwa 10 nm nachgewiesen werden, was auf die bekannte Assoziation des Phospholipids in Form inverser Mizellen hinweist. Durch elektronenmikroskopische Untersuchungen gelingt deren Visualisierung. In lecithinhaltigen Proben können neben den typischen planaren und geschichteten Flächen des Kristallgitters der Triglyceride auch Bereiche mit sphärischen Assoziaten beobachtet werden. Daraus kann gefolgert werden, dass diese inversen Mizellen auch im festen Zustand in gewissen Anteilen erhalten bleiben. In Einzelfällen können bei lecithinhaltigen Lipiden, die sehr schnell erstarren gelassen werden, hexagonale Flüssigkristalle beobachtet werden. Lecithin liegt zumindest partiell als entsprechendes Assoziat von Röhren vor. Mit Hilfe der Polarisationsmikroskopie wird beobachtet, dass die Schmelze lecithinhaltiger Systeme bei

Wasserkontakt in eine lamellare Mesophase transformiert. Diese Transformation findet jedoch in festem Zustand nicht statt, da die amphiphilen Moleküle immobilisiert vorliegen.

In der Schmelze der Lecithin-Hartfett-Mischungen können Arzneistoffe in hohem Maße solubilisiert werden, wobei die solubilisierte Menge linear mit dem Lecithingehalt steigt. Dies beweist, dass Interaktionen der Arzneistoffe mit dem Phospholipid stattfinden bzw., dass die Arzneistoffe in inverse Mizellen inkorporiert werden. Abbildung 4.21 stellt die mögliche Lokalisation der Arzneistoffe in den inversen Mizellen in Anlehnung an die Ergebnisse von Papantoniou (1995), Schneeweis (1999) und Friedrich et al. (2000) dar.

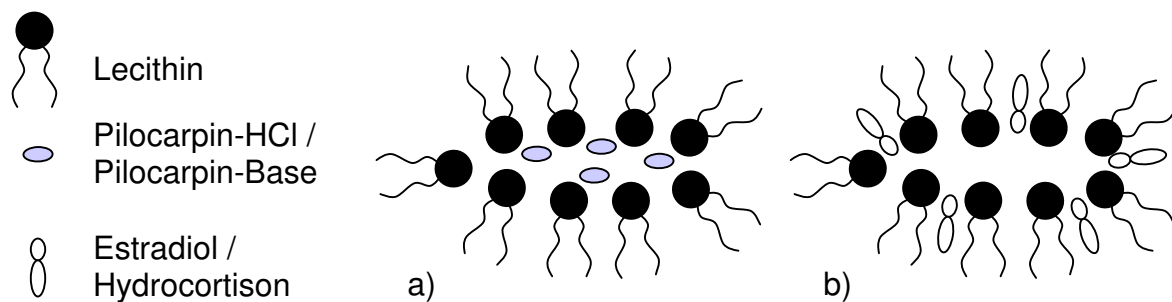


Abbildung 4.21: Postulierte Arzneistofflokalisierung in den Assoziaten, schematisch.

Das stark hydrophile Pilocarpin-HCl sollte sich im polaren Kern der inversen Mizellen aufhalten, ebenso die lipophilere, aber dennoch polare Pilocarpin-Base (Abbildung 4.21a). Die, schlecht in Wasser und Öl löslichen, Arzneistoffe Estradiol und Hydrocortison werden sich hingegen wahrscheinlich interkalierend zwischen den Lecithinmolekülen aufhalten (Abbildung 4.21b). Beide Stoffe haben ein Steroidgrundgerüst, das sich zwischen den lipophilen Fettsäureketten des Phospholipids positionieren kann. Die Moleküle besitzen jedoch durch zwei Hydroxylfunktionen beim Estradiol bzw. drei Hydroxylfunktionen und zwei Ketogruppen beim Hydrocortison auch polare Bereiche, sodass eine gewisse Amphiphilität vorhanden ist. Die polaren Gruppen haben eine entsprechende Affinität zu den polaren Kopfgruppen des Lecithins.

Für die weitere Arbeit, d.h. für die Entwicklung von Lipidnanosuspensionen, wird eine 1:1 (m/m) Mischung aus Lecithin und S100 bzw. S142 als Basis gewählt. Diese Mischungen bieten für die untersuchten Arzneistoffe eine ausreichend hohe Solubilisierung.

tionsfähigkeit. Andererseits sind sie nicht so weich und klebrig wie Mischungen mit 60 % (m/m) Lecithin, wodurch die weitere Verarbeitung verbessert wird. Aufgrund der hohen solubilisierbaren Arzneistoffmengen und damit einhergehend günstiger Verteilungskoeffizienten ist von einer langsamen Diffusion der Arzneistoffe aus der Lipidmatrix auszugehen.

Die Lecithin-Hartfett-Mischungen werden im Folgenden als erstarrte invers mizellare Lösungen bezeichnet und als SRMS abgekürzt (vom Englischen: solidified reverse micellar solutions). Die 1:1 (m/m) Mischungen werden, je nach verwendetem Hartfett, als SRMS100 bzw. SRMS142 bezeichnet. Zudem wird Pilocarpin-HCl aufgrund der, im Vergleich zur Base, geringeren solubilisierten Menge nicht weiter untersucht und ausschließlich die Base verwendet.

4.3 Entwicklung SRMS basierter Nanosuspensionen

In diesem Abschnitt wird die Entwicklung und Herstellung von SRMS basierten Nanosuspensionen erläutert. Aufgrund der, in Abschnitt 4.2 dargestellten, Ergebnisse der Charakterisierung von Lecithin-Hartfett-Mischungen wird als Lipidmatrix, d.h. als Material für die Lipidnanopartikel, eine 1:1 (m/m) Mischung aus Lecithin und Hartfett gewählt, die als SRMS100 (P90G/S100 1:1 (m/m)) bzw. SRMS142 (P90G/S142 1:1 (m/m)) bezeichnet wird.

Die alleinige Stabilisierung von Lipidnanosuspensionen durch Phospholipide kann nach Westesen und Siekmann (1997) durch Ausbildung eines Netzwerks zu halbfesten Gelen führen. Aus diesem Grund und vor allem, da das in die Fettphase inkorporierte Lecithin hauptsächlich der Solubilisation von Arzneistoffen dienen soll und nicht der Stabilisierung der Systeme, wird die Eignung der Emulgatoren Polysorbat 80 und Poloxamer 188 für eine erfolgreiche Dispergierung der Lipidnanopartikel untersucht. Des Weiteren soll die Diffusion des Lecithins aus der Fettphase in die wässrige Außenphase so gering wie möglich sein, damit keine Vesikelbildung stattfindet bzw. die Partikel nicht von Phospholipid-Multilayern umgeben werden. Entsprechend wird eine Kalthomogenisation durchgeführt. Eine grobdisperse Vorsuspension wird durch Mahlen der Fettphase in flüssigem Stickstoff und anschließende Suspendierung in der wässrigen Phase bei Raumtemperatur hergestellt. Durch diese Technik soll ebenfalls ein möglicher Lecithinverlust aus der Fettphase minimiert werden.

4.3.1 Einfluss des Emulgators auf Partikelgrößen und Stabilität der Nanosuspensionen

4.3.1.1 Stabilisierung mit Poloxamer 188

Zur Untersuchung der stabilisierenden Eigenschaften des Polymeremulgators Poloxamer 188 und seiner Eignung für die herzustellenden Systeme, werden Suspensionen mit einem Lipidanteil von 5 % (m/m) SRMS100 bzw. SRMS142 und einem Poloxamer/SRMS-Verhältnis von 1:2 (m/m) bei einem Homogenisierdruck von 1000 bar hergestellt. Der Hochdruckhomogenisator wird dabei durch ein Eisbad gekühlt (vgl. Abschnitt 3.2.3). Tabelle 4.3 stellt die Ergebnisse der Partikelgrößenbestimmung dar.

Tabelle 4.3: Mittlere Partikelgrößen (z-average) [nm] und Polydispersitätsindices (PI) der, mit Poloxamer stabilisierten, Lipidsuspensionen (n=3).

Passagen	5 % (m/m) SRMS100		5 % (m/m) SRMS142	
	z-average	PI	z-average	PI
1	664,5 ± 122,6	1 ± 0	702,4 ± 30,1	1 ± 0
5	423,3 ± 40,8	0,891 ± 0,099	770,7 ± 155,0	1 ± 0
10	639,9 ± 66,5	1 ± 0	584,3 ± 50,7	0,959 ± 0,070

Die, mit diesem Emulgator erzielten, Ergebnisse sind ungenügend, da einerseits keine Partikel im unteren Nanometerbereich in enger Verteilung hergestellt werden können. Die mittleren Partikelgrößen liegen mit 600-800 nm nach 10 Passagen noch in einem hohen Bereich, zudem sind die Schwankungen beträchtlich. Die Partikelgrößenverteilungen sind dabei nicht monomodal, sondern bi- bis multimodal.

Andererseits kommt es nach zwei Tagen Lagerung bei Raumtemperatur zur Ausbildung halbfester Systeme, die sich durch Schütteln allerdings wieder verflüssigen lassen. Die Poloxamerkonzentration (2,5 % (m/m)) scheint ungeeignet zu sein. Da auch bezüglich der Einzelpartikel keine zufriedenstellenden Ergebnisse mit dem Emulgator erreicht werden können, wird auf die weitere Verwendung von Poloxamer verzichtet und die weitere Entwicklung und Herstellung der Systeme mit Polysorbat 80 durchgeführt.

4.3.1.2 Stabilisierung mit Polysorbat 80

Um den Einfluss des O/W-Emulgators Polysorbat 80 auf die Partikelgrößen und Partikelgrößenverteilungen der Nanosuspensionen zu untersuchen, werden Systeme mit 5 und 15 % (m/m) SRMS100 bzw. 5 % (m/m) SRMS142 als Lipidmatrix bei einem Homogenisierdruck von 1000 bar und einer Homogenisierungsdauer von 5 und 10 Passagen hergestellt. Zur Bestimmung einer geeigneten Emulgatorkonzentration werden unterschiedliche Konzentrationen an Polysorbat 80 zugesetzt, sodass Emulgator/SRMS-Verhältnisse von 1:10 bis 1:2 (m/m) resultieren. Der Hochdruckhomogenisator wird dabei wiederum durch ein Eisbad gekühlt (vgl. Abschnitt 3.2.3). Tabelle 4.4 stellt die mittleren Partikelgrößen der Suspensionen dar, die Polydispersitätsindices als Maß für die Breite der Verteilung sind Tabelle 4.5 zu entnehmen.

Tabelle 4.4: Mittlere Partikelgrößen (z-average) [nm] der, mit PS80 stabilisierten, Lipidsuspensionen in Abhängigkeit vom PS80/SRMS-Verhältnis (n=3).

Verhältnis (m/m)	5 % (m/m) SRMS100		15 % (m/m) SRMS100		5 % (m/m) SRMS142	
	5 Pass.	10 Pass.	5 Pass.	10 Pass.	5 Pass.	10 Pass.
1:10	458,7 ± 18,2	371,9 ± 9,9	858,4 ± 58,8	857,6 ± 62,2	557,6 ± 37,7	413,5 ± 14,8
1:5	408,9 ± 39,5	331,6 ± 13,1	454,5 ± 32,0	413,1 ± 8,0	350,5 ± 9,8	312,2 ± 2,7
1:3,3	335,2 ± 7,5	290,2 ± 7,0	479,3 ± 16,2	483,4 ± 54,0	403,0 ± 53,5	336,8 ± 8,2
1:2,5	378,8 ± 19,9	416,2 ± 12,0	473,5 ± 28,8	418,3 ± 40,0	367,1 ± 1,5	323,6 ± 6,6
1:2	365,6 ± 6,4	299,6 ± 10,1	412,2 ± 18,9	319,0 ± 4,0	371,7 ± 16,0	309,5 ± 5,7

Tabelle 4.5: Polydispersitätsindices (PI) der, mit PS80 stabilisierten, Lipidsuspensionen in Abhängigkeit vom PS80/SRMS-Verhältnis (n=3).

Verhältnis (m/m)	5 % (m/m) SRMS100		15 % (m/m) SRMS100		5 % (m/m) SRMS142	
	5 Pass.	10 Pass.	5 Pass.	10 Pass.	5 Pass.	10 Pass.
1:10	0,740 ± 0,070	0,599 ± 0,040	1 ± 0	1 ± 0	0,847 ± 0,079	0,658 ± 0,060
1:5	0,743 ± 0,126	0,561 ± 0,060	0,813 ± 0,103	0,698 ± 0,016	0,483 ± 0,046	0,396 ± 0,039
1:3,3	0,551 ± 0,011	0,416 ± 0,030	0,856 ± 0,075	0,936 ± 0,111	0,640 ± 0,175	0,525 ± 0,051
1:2,5	0,666 ± 0,047	0,712 ± 0,042	0,824 ± 0,094	0,843 ± 0,149	0,486 ± 0,027	0,428 ± 0,021
1:2	0,559 ± 0,019	0,446 ± 0,044	0,777 ± 0,038	0,532 ± 0,020	0,500 ± 0,057	0,394 ± 0,024

Wie aus Tabelle 4.4 ersichtlich ist, entsprechen die Partikelgrößen bei den gewählten Bedingungen keinesfalls den Erwartungen an Nanopartikel im unteren Nanometerbereich. Auch die Partikelgrößenverteilungen (Tabelle 4.5) sind nicht ausreichend eng, wie es für ein stabiles System erforderlich wäre. Messtechnisch ist eine enge Verteilung durch einen Polydispersitätsindex kleiner als 0,20 gekennzeichnet, wobei zwischen 0,03 und 0,06 Monodispersität vorliegt. Bei einem PI von 0,25 bis 0,5 handelt es sich um breite Verteilungen und Werte über 0,50 gelten als nicht auswertbar [Müller und Schuhmann 1996].

Aus den Ergebnissen ist jedoch abzuleiten, dass ein PS80/SRMS-Verhältnis von 1:5 (m/m) der beste Kompromiss zwischen einer deutlich erkennbaren Reduktion der Partikelgrößen bzw. Verkleinerung des PI und der Verwendung einer möglichst geringen Emulgatorkonzentration zur Minimierung des Irritationspotentials nach topischer Applikation ist. In der Regel ist durch Verwendung eines 1:5 (m/m) Verhältnisses eine klare Reduktion der Partikelgrößen und Polydispersitätsindices, im Vergleich zum 1:10 (m/m) Verhältnis, zu erzielen. Durch höhere Emulgatorkonzentrationen ist danach nur in Ausnahmefällen eine Verringerung der Werte zu beobachten. Im Falle des SRMS142-haltigen Systems können die kleinsten Partikel mit der engsten Verteilung bereits bei dem Verhältnis 1:5 (m/m) erreicht werden.

Ein Verhältnis von 1:10 (m/m) führt nicht nur zu wesentlich größeren Partikeln, sondern es kommt zudem zur Ausbildung halbfester Systeme unter vierwöchiger Lagerung bei Raumtemperatur. Diese Gelbildung wurde bereits von Westesen und Siekmann (1997) als unvollständige Benetzung der Kristalloberflächen durch den Emulgator beschrieben. Dies kann einerseits durch einen sogenannten „langsamen“ Emulgator verursacht werden, der neu geschaffene Oberflächen mit zu geringer Geschwindigkeit benetzt, andererseits sind zu geringe Mengen des Emulgators die Ursache für eine unzureichende Adsorption.

Neben dem Einfluss der Konzentration des Emulgators als primäres Ziel dieser Versuche, kann eine weitere Verkleinerung der Partikel durch die Verdopplung der Homogenisierungsdauer, d.h. Homogenisation über 10 statt 5 Passagen, beobachtet werden.

Trotz der nicht zufriedenstellenden Ergebnisse scheint Polysorbat 80 für die Stabilisierung der Lipidnanosuspensionen geeigneter zu sein als Poloxamer 188. Darauf weisen die erzielten kleineren Partikel, die in engerer Verteilung vorliegen, hin. Aufbauend auf diesen Ergebnissen muss eine entsprechende Optimierung der Prozessparameter erfolgen.

4.3.2 Optimierung des Homogenisierprozesses

Die weiterführende Verbesserung des Homogenisierprozesses wird mit dem, in Abschnitt 4.3.1.2 als bestem Kompromiss angesehenen, PS80/SRMS-Verhältnis von 1:5 (m/m) durchgeführt. Bei den folgenden Versuchsreihen erfolgt die Vorsuspendierung der SRMS per Ultra-Turrax und nicht per Magnetrührer, um von vornherein ein feineres Ausgangsprodukt einzusetzen.

Zunächst wird der Einfluss der Homogenisiertemperatur auf die Partikelgrößen untersucht. Dabei wird den oben angestellten Überlegungen Rechnung getragen und keine Heißhomogenisation, d.h. Homogenisation bei einer Temperatur weit oberhalb der Schmelzpunkte der Lipide [Müller und Lucks 1996], durchgeführt, sondern lediglich auf die Eisbadkühlung verzichtet und bei Raumtemperatur homogenisiert. Abbildung 4.22 zeigt die Ergebnisse des Vergleichs einer Homogenisation unter Eisbadkühlung und der Homogenisation bei Raumtemperatur (vgl. Abschnitt 3.2.3).

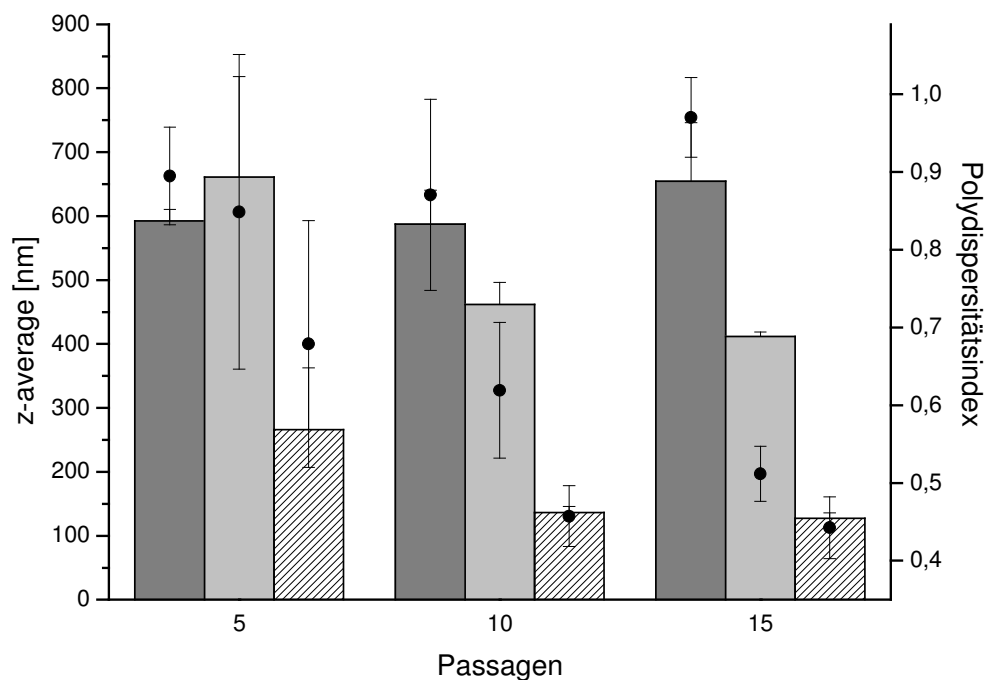


Abbildung 4.22: Mittlere Partikelgrößen (z-average, Säulen) und Polydispersitätsindizes (Punkte) nach Homogenisation bei 1000 bar unter Eiskühlung (EIS, n=3) oder bei Raumtemperatur (RT, n=6). 5 % (m/m) SRMS100 - EIS ■, 5 % (m/m) SRMS142 - EIS ■, 5 % (m/m) SRMS100 - RT ▨.

Durch die Verwendung eines Eisbads, in das alle produktführenden Bereiche des Homogenisators eintauchen, wird das Produkt auf eine Temperatur von 6-10 °C heruntergekühlt. Diese niedrige Temperatur, bei der die Lipide in nicht geschmolzenem, rigidem Zustand vorliegen, führt zu Partikelgrößen von 400-800 nm bei breiter Verteilung. Die Polydispersitätsindizes dieser Systeme liegen sämtlich über 0,50 und haben große Standardabweichungen. Im Gegensatz dazu führt eine Homogenisation bei Raumtemperatur, d.h. eine Produktion ohne weitere Temperierung, zu signifikant kleineren Partikeln und engeren Verteilungen (z-average 100-200 nm, PI < 0,50).

Der Einfluss weiterer variabler Prozessparameter (Lipidanteil, Homogenisierdruck, Anzahl der Passagen) auf die Partikelgrößen von SRMS100-haltigen Systemen ist in Abbildung 4.23 dargestellt.

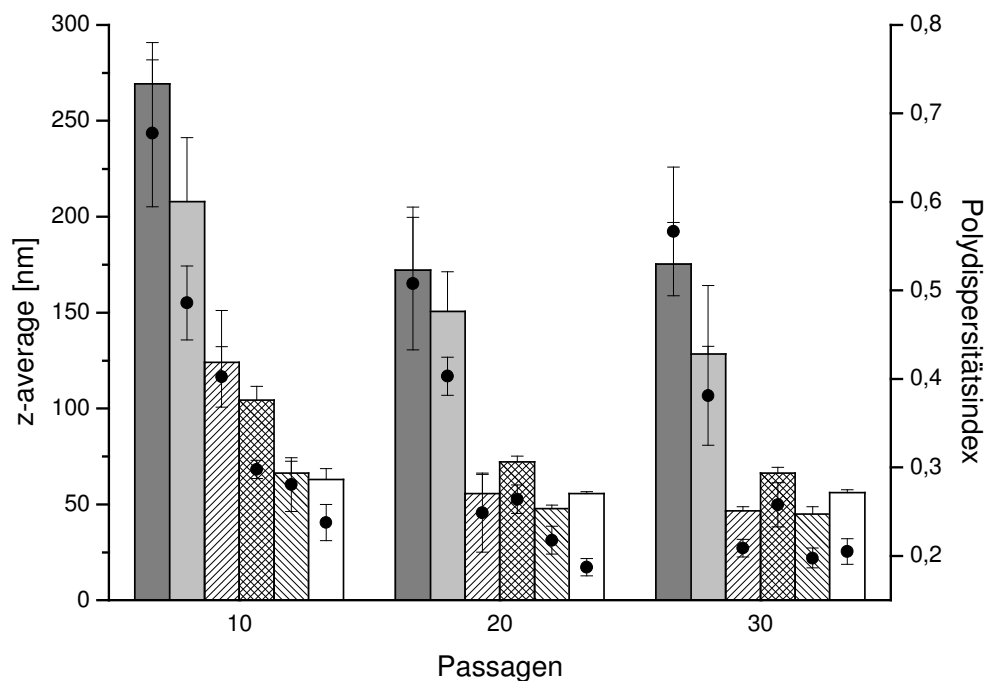


Abbildung 4.23: Mittlere Partikelgrößen (z-average, Säulen) und Polydispersitätsindizes (Punkte) von SRMS100-haltigen Nanosuspensionen in Abhängigkeit von Passagen, Druck und Lipidanteil nach Homogenisation bei Raumtemperatur (RT) oder mit einer Kühlschlange (CC) (n=6). 5 % (m/m) - 1000 bar - CC ■, 15 % (m/m) - 1000 bar - CC ■, 5 % (m/m) - 1000 bar - RT ▨, 15 % (m/m) - 1000 bar - RT ▩, 5 % (m/m) - 1500 bar - RT ▤, 15 % (m/m) - 1500 bar - RT □.

Eine Hochdruckhomogenisation bei Raumtemperatur führt, abhängig vom Homogenisierdruck, zu Produkttemperaturen von 33-37 °C (1000 bar) bzw. 40-44 °C (1500 bar). Nach Homogenisation unter diesen Bedingungen liegen alle Partikelgrößen nach 20 Passagen unter 80 nm und die Polydispersitätsindices sind kleiner als 0,30. Dies spricht für eine schmale Partikelgrößenverteilung.

Die Partikelgrößen und Polydispersitätsindices werden durch einen höheren Homogenisierdruck von 1500 bar und eine entsprechend höhere Produkttemperatur, im Vergleich zu einem Druck von 1000 bar, weiter verringert. Da die Kräfte, die auf die Partikel wirken (Prall-, Scher- und Kavitationskräfte), bei diesem Druck natürlich höher sind, andererseits die Viskosität des Gesamtsystems, aber auch die der dispergierten Tröpfchen erniedrigt ist, entspricht diese weitere Zerkleinerung den Erwartungen [Jahnke 2001]. Auch durch eine längere Homogenisierungsdauer kann zumindest bis zu 20 Passagen noch eine deutliche Reduktion der Partikelgrößen erzielt werden, weitere Homogenisation über 30 Passagen hat keine bzw. nur minimale Effekte. Dass die, in Abbildung 4.23 dargestellten, Systeme mit 15 % (m/m) SRMS100 tendenziell leicht erniedrigte Partikelgrößen, im Vergleich zu denen mit 5 % (m/m) Lipidanteil, zeigen, liegt darin begründet, dass diese Systeme immer zeitlich nach den 5 %igen (m/m) Systemen homogenisiert werden. Das Kolben-Spalt-Ventil des Hochdruckhomogenisators ist durch diese vorangegangene Homogenisation vorgewärmt, was einen positiven Effekt auf nachfolgende Systeme hat.

Obwohl eine weitere Partikelzerkleinerung möglich ist, können SRMS100-basierte Nanosuspensionen mit ausreichend kleinen Partikeln in enger Verteilung bei einem Homogenisierdruck von 1000 bar und einer Dauer von 20 Passagen hergestellt werden.

Mit Nanosuspensionen, die das höher schmelzende SRMS142 enthalten, können durch Homogenisation bei 1500 bar und Raumtemperatur Partikelgrößen in einem ähnlichen Bereich wie bei SRMS100-haltigen Systeme erzielt werden (Abbildung 4.24). Dagegen zeigen die, bei 1000 bar homogenisierten, Suspensionen mit SRMS142, im Vergleich zu den SRMS100-haltigen, signifikant größere Partikel (200-400 nm) mit breiterer Verteilung ($PI > 0,30$). Der Druck bzw. die Temperatur ist für dieses höher schmelzende Lipid mit längeren Fettsäureketten nicht ausreichend, um kleine Partikel zu erhalten.

Zudem kann beobachtet werden, dass der alleinige Einsatz einer nachgeschalteten Kühlschlange bei den Suspensionen mit SRMS100 zu schlechten Verteilungen führt

(Abbildung 4.23). Die Produkttemperatur liegt unter diesen Bedingungen mit 12-18 °C bei einem Druck von 1000 bar ebenfalls weit unter dem Schmelzpunkt des Lipids. Bei dieser Temperatur liegen die Partikel ausschließlich in fester Form vor, was einer effektiven Zerkleinerung entgegenwirkt.

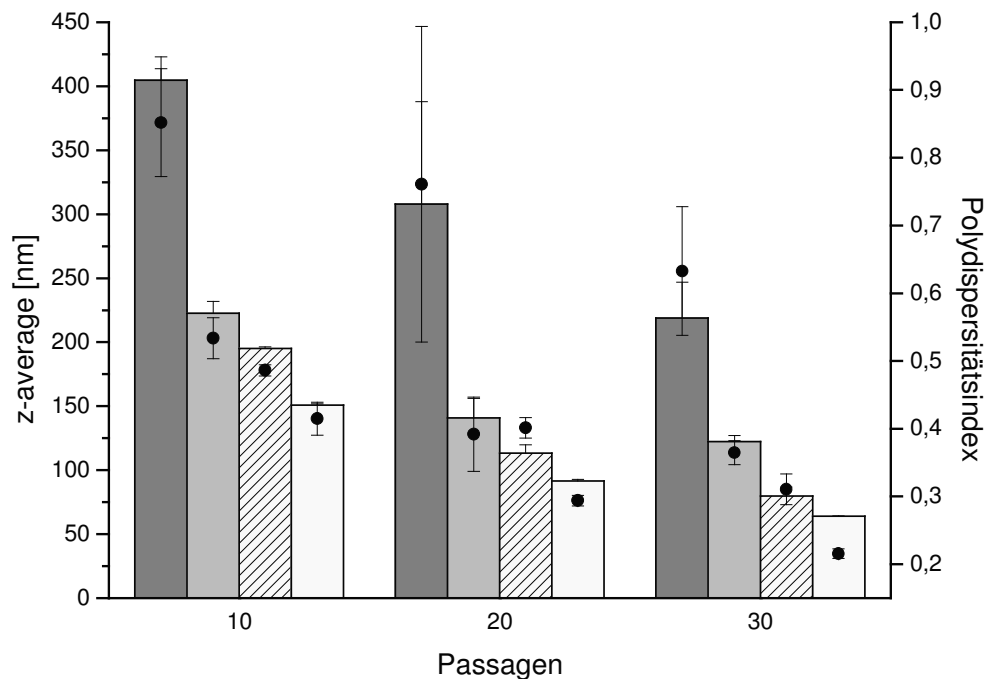


Abbildung 4.24: Mittlere Partikelgrößen (z-average, Säulen) und Polydispersitätsindizes (Punkte) von SRMS142-haltigen Nanosuspensionen in Abhängigkeit von Passagen, Druck und Lipidanteil (n=6). 5 % (m/m) - 1000 bar ■, 15 % (m/m) - 1000 bar ■, 5 % (m/m) - 1500 bar ▨, 15 % (m/m) - 1500 bar □.

Zur Erzielung ausreichend kleiner Partikel, die in enger Verteilung vorliegen sollten, damit eine ausreichende Stabilität der Nanosuspensionen gewährleistet ist, ist eine Kalthomogenisation, bei der das Produkt weit unter den Schmelzpunkt der Lipide (SRMS100: 34-35 °C, SRMS142: 42-43 °C) gekühlt wird, nicht geeignet. Eine Heißhomogenisation bei sehr hohen Temperaturen ist jedoch nicht erforderlich, sondern es genügt, die Produkttemperatur im Bereich des Schmelzpunkts zu halten. Dies kann durch eine Kalthomogenisation bei Raumtemperatur erreicht werden, bei der die Temperatur der Suspension durch den Homogenisierdruck kontrolliert werden kann.

4.3.3 Zusammenfassende Diskussion der Ergebnisse der Entwicklung SRMS basierter Nanosuspensionen

Der Polymeremulgator Poloxamer 188 ist für die zu entwickelnden Nanosuspensionen auf Basis der erstarrten invers mizellaren Lösungen (SRMS) nicht geeignet. Selbst ein hoher Anteil des Poloxamers (Emulgator/SRMS 1:2 (m/m)) führt bei einer Kalthomogenisation bei 1000 bar zu großen Partikeln über 500 nm und inakzeptablen Partikelgrößenverteilungen mit Polydispersitätsindices nahe 1. Zudem kommt es unter Lagerung zur Ausbildung eines thixotropen Gels, das durch mechanische Beanspruchung verflüssigbar ist. Obwohl die gewählte Konzentration mit 2,5 % (m/m) vergleichsweise hoch ist, ist sie zur Stabilisierung kleiner Partikel unzureichend.

Die Verwendung von Polysorbat 80 als stabilisierende Komponente lässt die Produktion kleinerer Partikel schon bei Eisbadkühlung zu. Dabei ist ein PS80/SRMS-Verhältnis von 1:5 (m/m) ausreichend für eine Partikelgrößenreduktion. Ein Verhältnis von 1:10 (m/m) führt zu größeren Partikeln mit breiterer Partikelgrößenverteilung. Zudem kommt es unter Lagerung zur Ausbildung halbfester, cremeartiger Systeme, da der Emulgator die Kristalloberflächen nicht in ausreichendem Maße besetzen kann und somit die Wahrscheinlichkeit der Partikelagglomeration stark erhöht ist.

Höhere Emulgatorkonzentrationen (Verhältnis 1:3,3 bis 1:2 (m/m)) ermöglichen weder eine weitere deutliche Abnahme der Partikelgrößen, noch eine Verringerung des Polydispersitätsindex. Eine Nutzen-Risiko-Abwägung bezüglich der Emulgatorkonzentration führt entsprechend zu dem Ergebnis, dass für die notwendige Optimierung des Homogenisierungsprozesses ein PS80/SRMS-Verhältnis von 1:5 (m/m) gewählt wird. Die Emulgatorkonzentration sollte so niedrig wie möglich sein, um das Irritationspotential bei topischer Applikation zu minimieren, aber hoch genug, um die Herstellung stabiler Nanosuspensionen zu gewährleisten.

Die Produktion kleiner SRMS-Partikel ist durch eine Kalthomogenisation, die bei Temperaturen weit unter dem Schmelzpunkt der Lipidphase durchgeführt wird, nicht möglich. In Tabelle 4.6 sind die Produkttemperaturen, die während der Optimierung der Prozessparameter mit den unterschiedlichen Einstellungen beobachtet werden, zusammengefasst.

Tabelle 4.6: Produkttemperaturen [°C] während der Hochdruckhomogenisation. Messung hinter dem Homogenisierventil nach 5 Passagen.

Druck [bar]	Temperierung	Produkttemperatur
1000	Eisbad	6-10
1000	Kühlschlange	12-18
1000	keine (Raumtemperatur)	33-37
1500	keine (Raumtemperatur)	40-44

Um kleine Partikel mit schmaler Verteilung zu erhalten, ist eine Heißhomogenisation nicht notwendig. Die Produkttemperatur muss lediglich im Bereich des Schmelzpunkts der jeweiligen SRMS (SRMS100: 34-35 °C, SRMS142: 42-43 °C) gehalten werden, damit die festen Lipide nicht mehr so rigide, sondern flexibler bzw. partiell aufgeschmolzen sind und so eine Zerteilung von Partikeln erleichtert ist. Eine schmelzpunktnahe Homogenisation kann durch den Homogenisierdruck kontrolliert werden, wobei ein Druck von 1000 bar zu Temperaturen im Bereich des Schmelzpunkts von SRMS100 führt, ein Druck von 1500 bar zu Temperaturen in der Nähe des Schmelzpunkts von SRMS142 (vgl. Tabelle 4.6).

Bei Unterschreiten dieser Temperatur, wie z.B. bei der Hochdruckhomogenisation SRMS142-haltiger Systeme bei Raumtemperatur und einem Druck von 1000 bar, kommt es zu breiteren Partikelgrößenverteilungen mit größeren Partikeln. Dagegen führen die gleichen Bedingungen bei Suspensionen mit SRMS100 zu zufriedenstellenden Ergebnissen.

Um die Partikel so kurz wie möglich im Bereich des Schmelzpunkts der Lipide zu halten und somit eine Diffusion inkorporierter Arzneistoffe aus der Lipidmatrix in die wässrige Außenphase zu minimieren, wird eine Homogenisdauer von 20 Passagen als ausreichend zur Produktion genügend kleiner Partikel mit enger Verteilung angesehen. Eine längere Homogenisation führt nicht zu einer weiteren deutlichen Verkleinerung, während eine Homogenisation über lediglich 10 Passagen, vor allem bezüglich der Polydispersitätsindices, noch ungenügend erscheint.

4.4 Charakterisierung arzneistofffreier SRMS basierter Nanosuspensionen

In diesem Abschnitt wird auf die Eigenschaften der, im vorhergehenden Abschnitt 4.3 entwickelten, Nanosuspensionen eingegangen. Hierzu werden, im Hinblick auf die spätere Arzneistoffinkorporation, Systeme mit einem Lipidanteil von 15 % (m/m) untersucht. Die Hochdruckhomogenisation dieser Nanosuspensionen erfolgt, wie in Abschnitt 3.2.4 beschrieben, über 20 Passagen kontinuierlich bei einem Druck von 1000 bar (SRMS100-Systeme) bzw. 1500 bar (SRMS142-Systeme). Tabelle 4.7 gibt die Rezeptur der optimierten arzneistofffreien Nanosuspensionen wieder.

Tabelle 4.7: Rezeptur der arzneistofffreien Nanosuspensionen.

Komponente	Anteil [% (m/m)]
SRMS	15,0
PS80	3,0
Sorbitol	3,9
Thiomersal	0,005
Aqua. bidest.	ad 100,0

In wenigen Fällen, wie z.B. bei elektronenmikroskopischen Aufnahmen, werden Ergebnisse der Charakterisierung abweichender Systeme gezeigt. Dieses ist bei der jeweiligen Methode angegeben.

4.4.1 Elektronenmikroskopische Untersuchungen von Nanosuspensionen

Transmissionselektronenmikroskopische Untersuchungen erlauben eine visuelle Beurteilung von Größe, Form und Aussehen der Lipidnanopartikel, was eine sinnvolle Ergänzung anderer Methoden, wie der Photonenkorrelationsspektroskopie, darstellt. Typische Aufnahmen der Nanosuspensionen sind in den Abbildungen 4.25 und 4.26 dargestellt.

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigen Partikel, deren Durchmesser von 30-130 nm in guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen der PCS-Messungen sind.

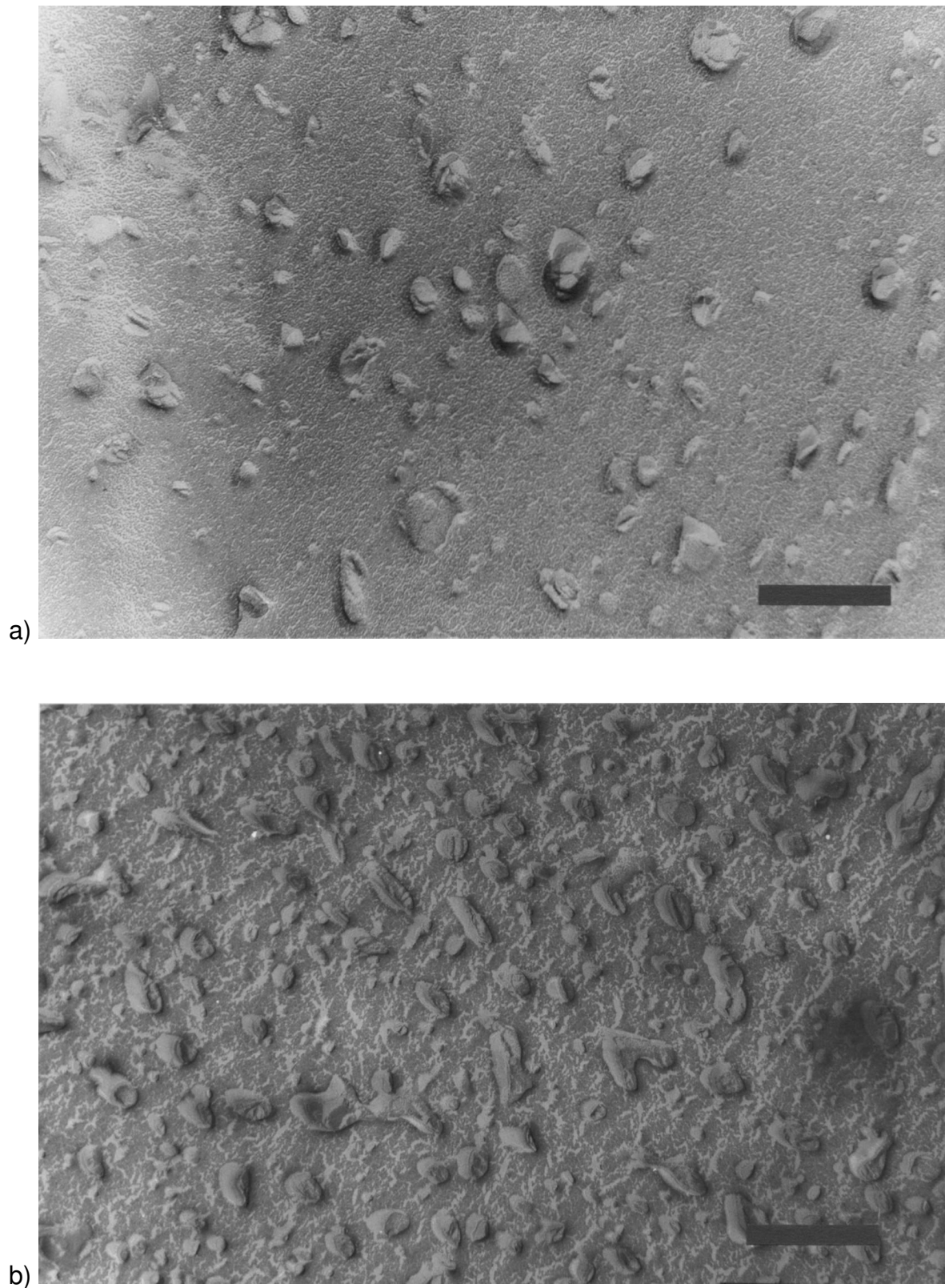


Abbildung 4.25: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von a) 5 % (m/m) SRMS100 (30 Passagen, 1000 bar, Balken = 238 nm) b) 15 % (m/m) SRMS100 (20 Passagen, 1000 bar, Balken = 370 nm).

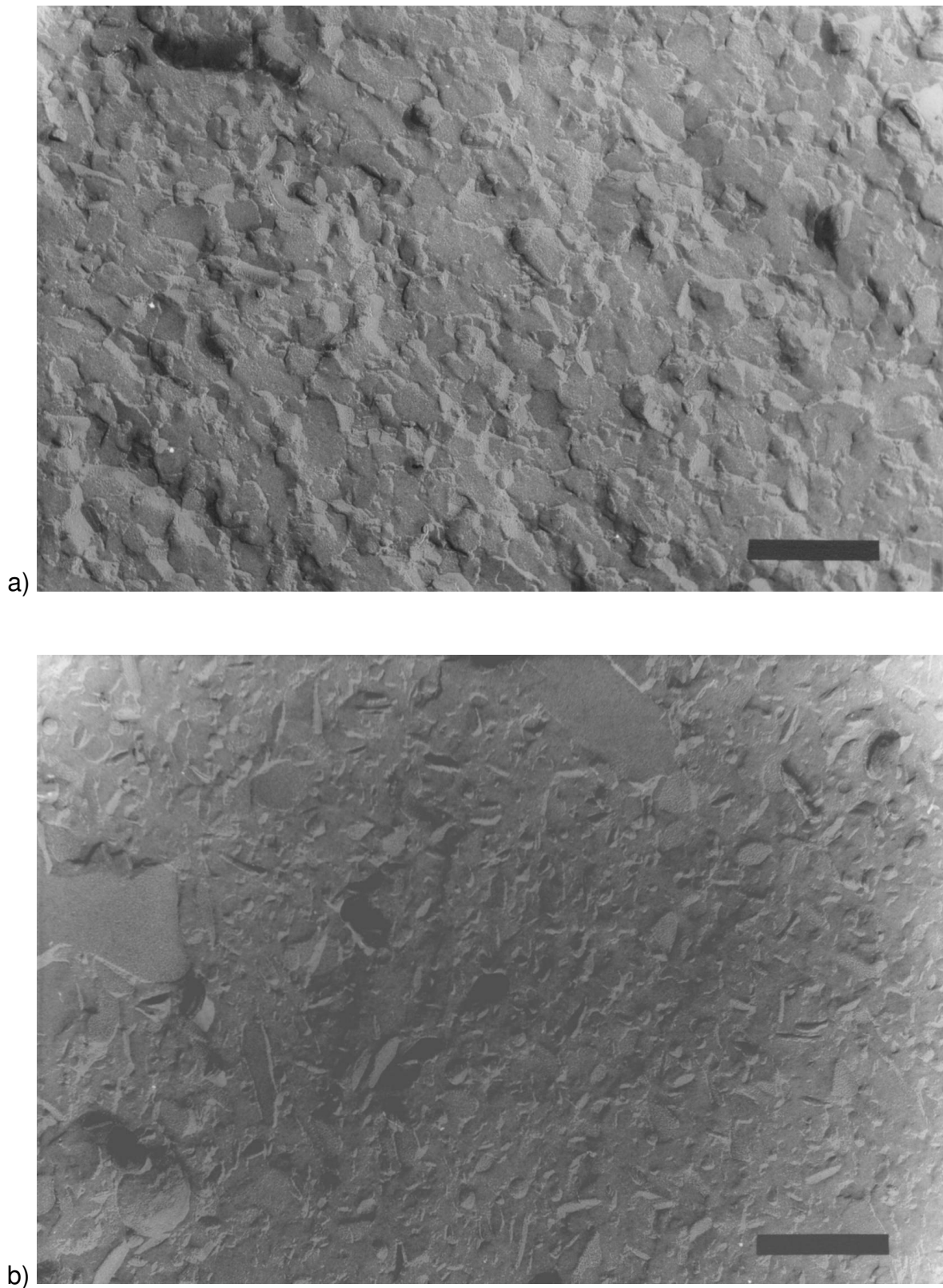


Abbildung 4.26: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von a) 5 % (m/m) SRMS142
b) 15 % (m/m) SRMS142. Beide: 20 Passagen, 1500 bar, Balken = 303 nm.

Dabei zeigen die, durch die Hochdruckhomogenisation erhaltenen, Nanopartikel eine anisometrische, oft plättchenartige Form, wie sie bereits von Siekmann und Westesen (1992, 1994b) beschrieben wurde. Innerhalb der Partikel können geschichtete Strukturen wie Stufen und Ecken beobachtet werden, was auf einen kristallinen Charakter der Partikel auch nach der Homogenisation hinweist. Das Vorliegen einer unterkühlten Schmelze, d.h. nicht-kristalliner, amorpher Partikel, kann somit ausgeschlossen werden. Diese amorphen Partikel wären von isometrischer, unstrukturierter Form [Westesen 2000] und können entstehen, wenn nach der Homogenisation die Dispersion nicht unter eine kritische Rekristallisationstemperatur gekühlt wird [Westesen und Bunjes 1995]. Da die Herstellung der SRMS basierten Nanosuspensionen aber die Lagerung bei 4-8 °C über Nacht einschließt, kann das Auftreten dieses Phänomens verhindert werden.

Obwohl die Systeme einen sehr hohen Gehalt an Lecithin besitzen, können isometrische Assoziate mit einer (uni)lamellaren Grenzfläche nicht gefunden werden. Diese Assoziate würden auf die Bildung von Liposomen hindeuten, die sich durch den Austritt von Lecithin aus den geschmolzenen Lipiden während des Homogenisierungsprozesses formieren könnten.

Wie aus Abbildung 4.27 (Pfeile) ersichtlich ist, bilden die plättchenförmigen Nanopartikel in einigen Fällen Agglomerate von wenigen Partikeln, die sich mit ihren flachen Seiten einander zuwenden und sich „geldstapelartig“ übereinander schichten. Diese Art der Agglomeration wird ebenfalls von Unruh et al. (1999) beobachtet.

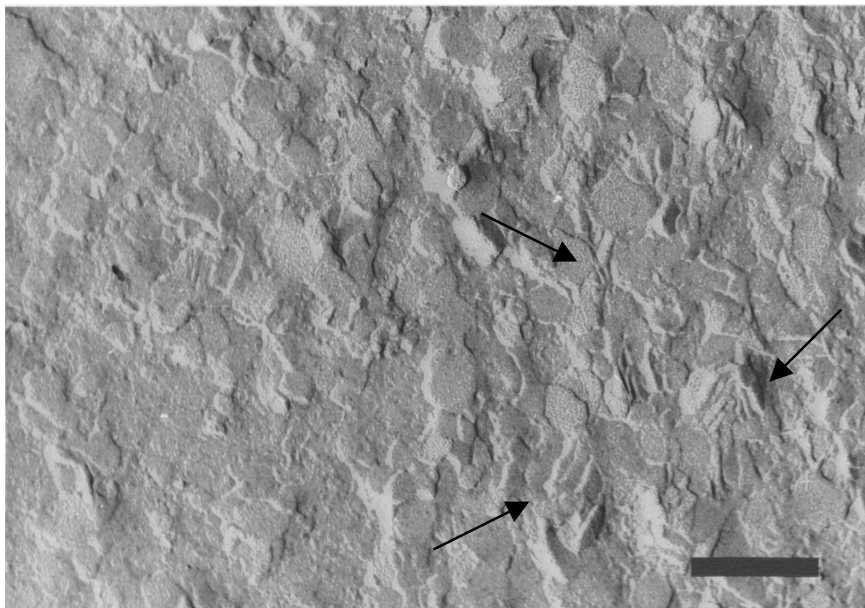


Abbildung 4.27: Agglomeration plättchenförmiger Nanopartikel (15 % (m/m) SRMS100, 20 Passagen, 1000 bar, Balken = 152 nm), Pfeile siehe Text.

4.4.2 Kapillarviskosimetrische Untersuchungen verdünnter Nanosuspensionen

Die mikroskopischen Ergebnisse ergänzende Aussagen über die Form und Anisotropie der Nanopartikel können über die Bestimmung der intrinsischen Viskosität (oder Grenzviskositätszahl nach Moore und Hummel 1986) $[\eta]$ getroffen werden. Voraussetzung hierfür ist die Untersuchung verdünnter Suspensionen, sodass Wechselwirkungen zwischen den Teilchen vermieden werden.

Die Nanosuspensionen mit einem SRMS-Anteil von 15 % (m/m) werden mit der Außenphase so verdünnt, dass Partikelkonzentrationen von 2,5-15,0 mg/ml resultieren, wobei die genannte Konzentration die Summe aus PS80 und SRMS ist, da davon ausgegangen wird, dass der, die Partikel stabilisierende, Emulgator den Partikeln und nicht der Außenphase zugerechnet werden muss. Nach Ermittlung der normierten spezifischen Viskosität mit Hilfe kapillarviskosimetrischer Untersuchungen und deren Auftragung über der Partikelkonzentration kann die intrinsische Viskosität $[\eta]$ durch Extrapolation auf die Konzentration null entsprechend Gleichung 4.7 bestimmt werden.

$$\eta = \eta_0 \cdot (1 + [\eta] \cdot c) \quad (\text{Gl. 4.7})$$

Dabei ist η die Viskosität der Dispersion, η_0 die Viskosität des Dispersionsmittels und c die Partikelkonzentration (m/V). Die intrinsische Viskosität wurde von Staudinger ursprünglich in die Polymerchemie eingeführt und wird dort als eine Art reziproke Polymerknäuel-dichte bei unendlicher Verdünnung beschrieben [Moore und Hummel 1986].

Für das Fließverhalten von Suspensionen kugelförmiger fester Partikel gilt nach Einstein (1922), dass die Viskositätserhöhung im Vergleich zum reinen Dispersionsmedium entsprechend der Gleichung 4.8 lediglich vom Volumenanteil der suspendierten Partikel abhängig ist.

$$\eta = \eta_0 \cdot (1 + 2,5 \cdot \varphi) \quad (\text{Gl. 4.8})$$

Die Zahl 2,5 ist ein, für kugelförmige Partikel geltender, Formfaktor, der sich nach Gleichung 4.9 bei kugelförmigen Teilchen mit einer Dichte ρ von 1 g/cm³ direkt aus der ermittelten intrinsischen Viskosität ergibt.

$$[\eta] \cdot \rho = 2,5 \quad (\text{Gl. 4.9})$$

Eine Abweichung von $[\eta]$ von 2,5 zu höheren Werten ist entsprechend ein Hinweis auf eine, mehr oder weniger stark ausgeprägte, Anisometrie der Teilchen. In der Literatur sind Formfaktoren für anisometrische Ellipsoide beschrieben, die sich aus der intrinsischen Viskosität ergeben [Adam 1988]. Bei bekannter Partikeldichte kann daraus das Halbachsenverhältnis a/b der Teilchen bestimmt werden, welches als Maß für die Anisometrie eines Partikels angesehen werden kann. In Abbildung 4.28 ist die normierte spezifische Viskosität gegen die Partikelkonzentration für die beiden Nanosuspensionen aufgetragen.

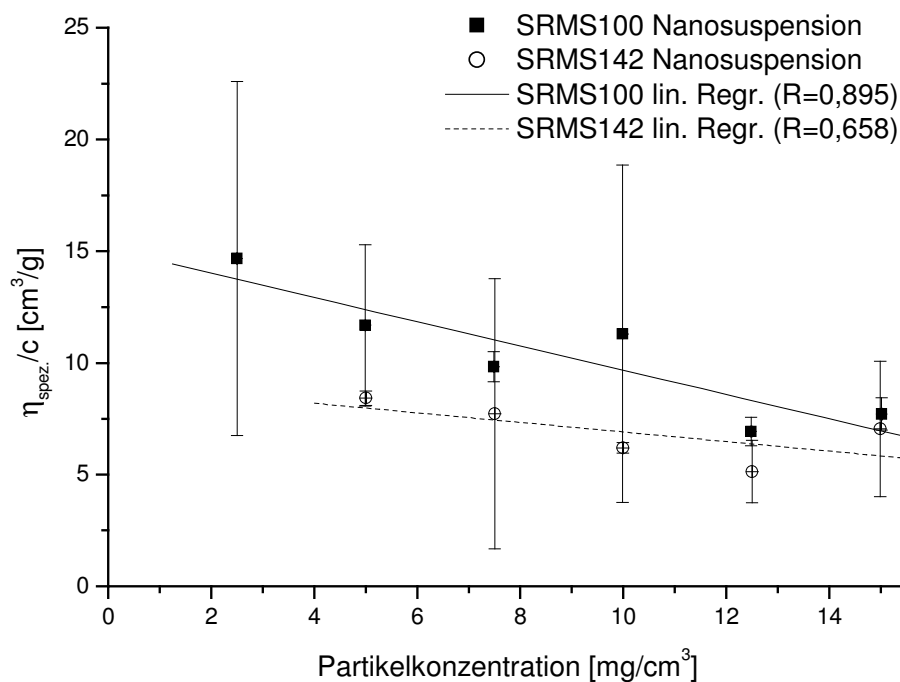


Abbildung 4.28: Normierte spezifische Viskosität gegen die Partikelkonzentration der Nanosuspensionen ($n=3$).

Die, durch Extrapolation der Graphen auf die Konzentration null, ermittelten Werte für die intrinsische Viskosität und die jeweils zugeordneten Halbachsenverhältnisse der Partikel für das Scheibchenmodell [Adam 1988] zeigt Tabelle 4.8.

Tabelle 4.8: Intrinsische Viskosität $[\eta]$ und Halbachsenverhältnisse a/b der Partikel für das Scheibchenmodell nach Adam (1988) bei einer angenommenen Assoziatdichte von 1 g/cm^3 .

System	$[\eta]$	a/b (Scheibchen)
SRMS100 Nanosuspension	15,1	19,5
SRMS142 Nanosuspension	9,1	11,3

Auf eine Zuordnung nach dem Stäbchenmodell wird nach den Ergebnissen der TEM-Untersuchungen verzichtet (vgl. Abschnitt 4.4.1). Aufgrund der hohen Standardabweichungen (siehe Abbildung 4.28) können die dargestellten Ergebnisse lediglich Tendenzen aufzeigen, dass die Nanopartikel in stark anisometrischer Form vorliegen, was die elektronenmikroskopischen Ergebnisse bestätigt. Das Halbachsenverhältnis der Partikel der SRMS100-haltigen Nanosuspension ist mit 19,5 größer als das der SRMS142-Partikel (11,3). Diese Tendenz ist elektronenmikroskopisch nicht präzise auswertbar, kann jedoch mit dem höheren Schmelzpunkt und der damit verbundenen höheren Rekristallisationstemperatur der SRMS142 erklärt werden. Nach der Homogenisation werden die Suspensionen relativ schnell abgekühlt und die SRMS142-Tröpfchen werden dabei früher erstarren als die SRMS100-haltigen, denen mehr Zeit zur Ausbildung anisometrischer Partikel zur Verfügung steht. Dies schlägt sich jedoch nicht in den, per PCS bestimmten, mittleren Partikeldurchmessern nieder, die in beiden Fällen 60-70 nm betragen. Der Polydispersitätsindex hingegen ist bei dem SRMS142-System mit 0,17 niedriger als der PI der SRMS100-haltigen Nanosuspension ($PI = 0,26$).

4.4.3 Untersuchungen zur Kristallinität der Nanopartikel

4.4.3.1 DSC-Untersuchungen von Nanosuspensionen

Bei der thermoanalytischen Untersuchung der Nanosuspensionen wird ein endothermer Schmelzvorgang detektiert (Abbildung 4.29), der den kristallinen Charakter der Lipidnanopartikel beweist. Wie Tabelle 4.9 zu entnehmen ist, findet der Schmelzübergang der SRMS-Nanopartikel jedoch bei Temperaturen statt, die 8-9 °C unterhalb der Schmelzpunkte des jeweiligen SRMS-Bulkmaterials liegt, was für Triglyceride auch von Siekmann und Westesen (1994c) beobachtet wurde.

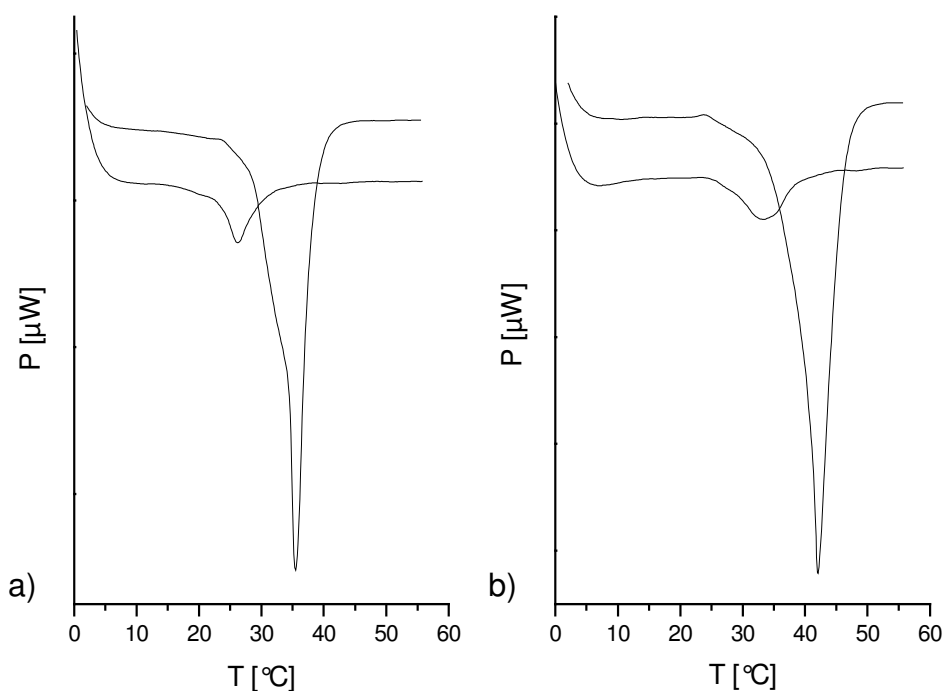


Abbildung 4.29: DSC-Thermogramme der 15 %igen (m/m) Nanosuspensionen (unten) und der Bulkmaterialien (oben). a) SRMS100-haltige Systeme b) SRMS142-haltige Systeme.

Tabelle 4.9: Schmelzpeakminima [$^{\circ}\text{C}$] (1 Tag nach Rekristallisation) und Schmelzenthalpien [mJ/mg] (5 Tage nach Rekristallisation) der 15 %igen (m/m) Nanosuspensionen ($n=4$) und der Bulkmaterialien ($n=2$).

System	Schmelzpeakminimum		Schmelzenthalpie	
	Bulk	Nanosuspension	Bulk	Nanosuspension
SRMS100	34,8 $\pm 0,2$	26,2 $\pm 0,1$	61,7 $\pm 0,6$	10,2 $\pm 0,6$
SRMS142	42,6 $\pm 0,2$	33,7 $\pm 0,3$	64,7 $\pm 0,3$	10,0 $\pm 0,3$

Die beobachtete Schmelzpunktdepression kann entweder auf das Vorliegen der Partikel in einer niedriger schmelzenden, instabilen α -Kristallmodifikation oder auf die kolloidalen Dimensionen der Partikel zurückgeführt werden. Durch ihre Partikelgrößen im unteren Nanometerbereich besitzen die Lipidpartikel ein sehr großes Oberflächen/Volumen-Verhältnis [Siekman und Westesen 1994c]. Dadurch befinden sich zahlreiche Moleküle in einem Zustand höherer Energie in der Oberfläche der Partikel, sodass eine niedrigere Temperatur zum Schmelzen der Partikel nötig ist.

Ein Absinken der Schmelztemperatur allein durch die geringere Einwaage kristallinen Materials, d.h. aufgrund eines Einwaageeffektes bei der Thermoanalyse, kann ausgeschlossen werden, da eine geringere Einwaage von 1,0-1,5 mg SRMS zu den gleichen Schmelzpunkten führt (SRMS100: 35,1 °C, SRMS142: 43,0 °C) wie die routinemäßig eingewogenen 5-6 mg (vgl. Tabelle 4.9).

Die Werte für die Schmelzenthalpien (Tabelle 4.9) entsprechen 16,5 % bzw. 15,5 % der Enthalpien der reinen SRMS100 bzw. SRMS142 Bulkproben, was mit der eingesetzten Lipidmenge in den Dispersionen sehr gut korreliert.

4.4.3.2 Röntgenuntersuchungen (WAXD) von Nanosuspensionen

Durch Röntgenweitwinkeluntersuchungen mit einer Debye-Scherrer-Kamera kann festgestellt werden, dass die Nanopartikel in einer stabilen β -Modifikation rekristallisieren. In Abbildung 4.30 ist beispielhaft eine Röntgenaufnahme einer SRMS142-haltigen Nanosuspension dargestellt.

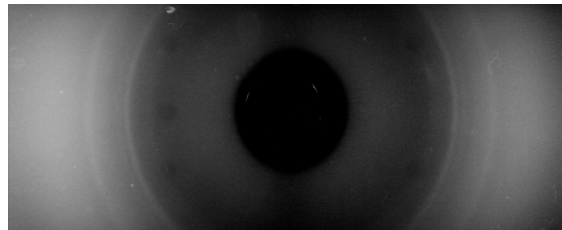


Abbildung 4.30: Debye-Scherrer-Aufnahme einer Nanosuspension mit 15 % (m/m) SRMS142 (aus Darstellungsgründen als Positiv).

Die, für eine β -Modifikation typischen und Netzebenenabständen von 0,37 und 0,46 nm entsprechenden, Röntgeninterferenzen [Larsson 1966, Hagemann 1988] lassen sich bei allen Präparaten der beiden Nanosuspensionen detektieren, während der ebenfalls charakteristische Netzebenenabstand von 0,39 nm fehlt bzw. aufgrund der unscharfen Beugungsringe nicht nachgewiesen werden kann.

Diese Befunde schließen eine α -Modifikation als Ursache für die, in Abschnitt 4.4.3.1 beschriebene, Schmelzpunktdepression aus. Vielmehr ist die Schmelzpunktdepression auf einen Partikelgrößeneffekt aufgrund des kolloidalen Charakters der Nanopartikel zurückzuführen. Unter der Voraussetzung, dass die Nanopartikel in einer β' -Modifikation vorlägen, sollten Partikel der gleichen Größe bei noch niedrigeren Temperaturen schmelzen. Die Schmelzpunktdepression müsste größer als die beobach-

teten 8-9 °C ausfallen, da die metastabile β' -Modifikation einen niedrigeren Schmelzpunkt als die stabile β -Modifikation besitzt.

Um einen Epitaxie-Effekt durch die Glaskapillare auszuschließen, werden auch die reinen erstarrten invers mizellaren Lösungen mit der Debye-Scherrer-Methode untersucht (Abbildung 4.31). Hierbei können, wie bei der in Abschnitt 4.2.1.3 verwendeten Goniometer-Methode, die Kristallebenenabstände 0,38 und 0,42 nm identifiziert werden, die eine β' -Modifikation kennzeichnen [Larsson 1966, Hagemann 1988].

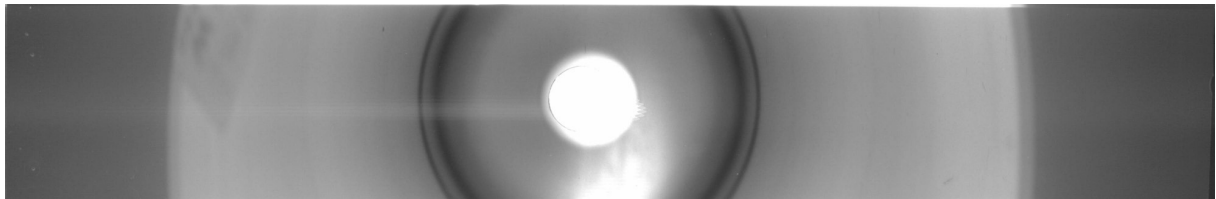


Abbildung 4.31: Debye-Scherrer-Aufnahme von SRMS142.

4.4.4 Korrelation thermoanalytischer Daten mit den Partikelgrößen

Während der ersten neun Tage nach der Herstellung der Nanosuspensionen kann, ausgehend von den, in Abschnitt 4.4.3.1 angegebenen, erniedrigten Werten, ein Ansteigen der Schmelztemperaturen der Systeme um 1-2 °C beobachtet werden (Abbildung 4.32). Dieser Schmelztemperaturanstieg geht einher mit einem Anstieg der Partikelgrößen, der in Abbildung 4.33 dargestellt ist. Nach drei Wochen Lagerung bleiben die Partikelgrößen konstant bei etwa 120-130 nm in den SRMS100-haltigen Systemen bzw. bei 100-110 nm in den Nanosuspensionen mit SRMS142. Im Vergleich zu den ursprünglichen Partikelgrößen von 70-80 nm direkt nach der Herstellung zeigt sich hier eine deutliche Zunahme. Im Gegensatz zu den Partikelgrößen bleiben die Polydispersitätsindices der Systeme auf dem gleichen Niveau von $0,232 \pm 0,027$ (SRMS100) bzw. $0,174 \pm 0,021$ (SRMS142) ($n=6$).

Eine Vergrößerung der Partikel kann zwei Ursachen haben, einerseits eine Agglomeration, andererseits ein Wachstum der Partikel durch Ostwaldreifung. Durch 10minütige Ultraschallbehandlung fünf Wochen nach der Herstellung können die Partikelgrößen wieder von 129 auf 68 nm (SRMS100) bzw. von 102 auf 87 nm (SRMS142) gesenkt werden.

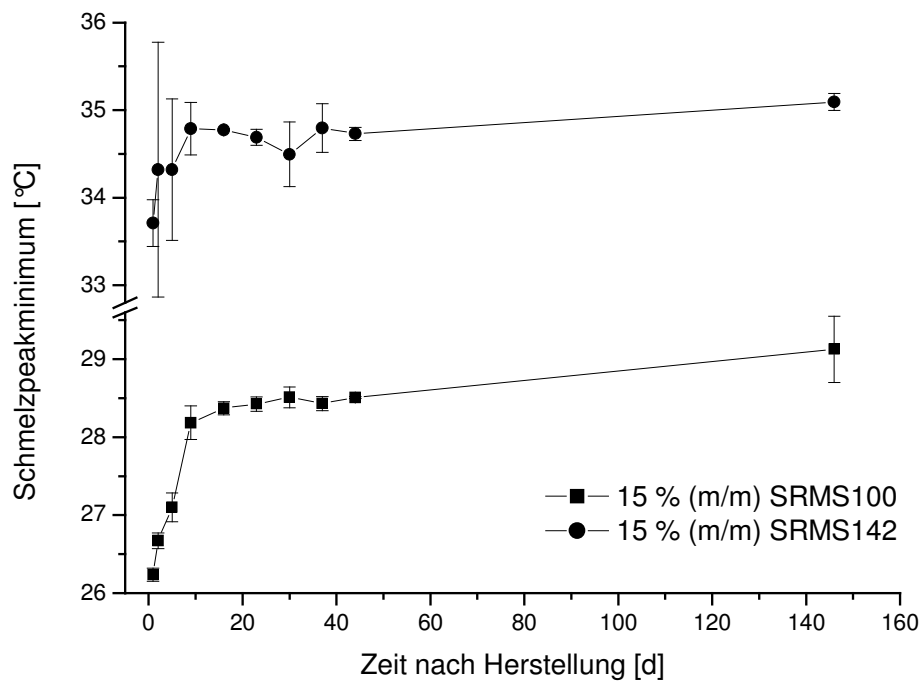


Abbildung 4.32: Schmelztemperaturen der Nanosuspensionen in Abhängigkeit von der Lagerzeit (n=4).

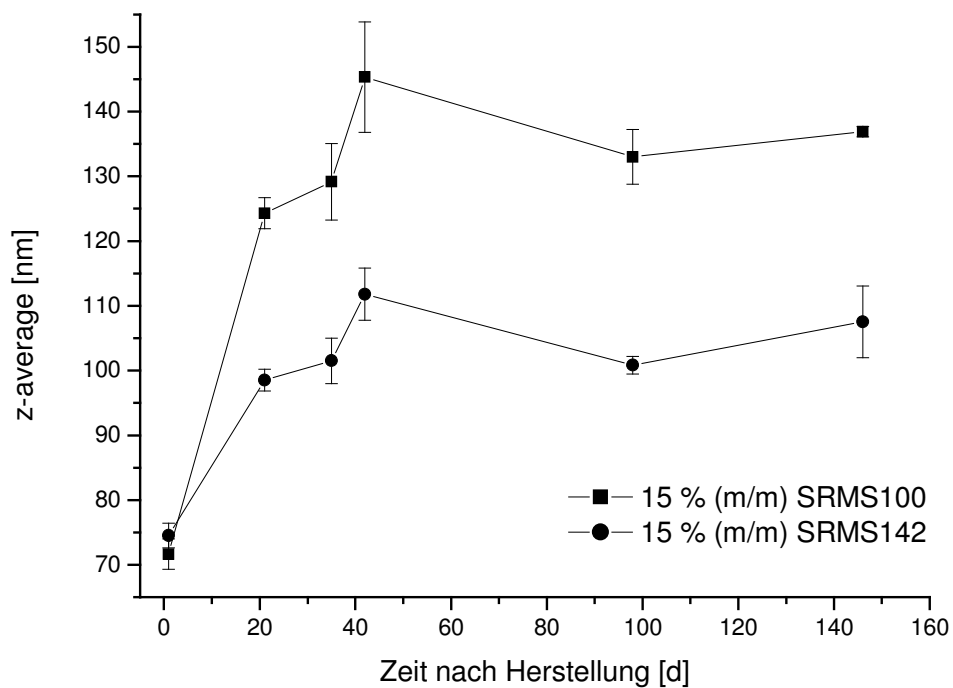


Abbildung 4.33: Mittlere Partikelgrößen (z-average) der Nanosuspensionen in Abhängigkeit von der Lagerzeit (n=6).

Dieser Befund spricht für die Zerteilung von Agglomeraten, obwohl unter den angewendeten Bedingungen eine Zerteilung individueller Einzelpartikel nicht ausgeschlossen werden kann.

Der Partikelgrößenanstieg tritt nicht in jedem Fall so deutlich und nach so kurzer Zeit wie im obigen Fall auf. Bei weiteren Messreihen konnte lediglich ein geringer Anstieg der Partikelgrößen von 69 auf 77 nm (SRMS100) bzw. 85 auf 122 nm (SRMS142) innerhalb von 20 Wochen festgestellt werden. Liegen von Beginn an große Partikel vor, so findet innerhalb von 7 Wochen nahezu keine Agglomeration statt (SRMS100: 140 auf 147 nm, SRMS142: 93 auf 113 nm).

Ein Anwachsen des z-average in den beobachteten Dimensionen ist mit Hilfe elektronenmikroskopischer Untersuchungen nicht nachzuvollziehen, da eine statistisch sichere Auswertung von Partikelgrößen mit dem verwendeten Elektronenmikroskop nicht gewährleistet ist. Der z-average ist ein mittlerer Partikeldurchmesser einer Partikelgrößenverteilung und berücksichtigt eine Vielzahl von Partikeln. Weder können im TEM größere Agglomerate als die, in Abschnitt 4.4.1 beschriebenen, übereinander geschichteten Partikel beobachtet werden, noch kann nach 7 Wochen ein Anwachsen der Durchmesser von Einzelpartikeln festgestellt werden. Allerdings könnten Agglomerate bei der Probenpräparation zerteilt werden.

4.4.5 Bestimmung des Zetapotentials und des pH-Wertes der Nanosuspensionen

Die, in Abschnitt 4.4.4 postulierte, Agglomerationsneigung der Partikel kann durch die Untersuchung der Zetapotentiale der Systeme weiter unterstützt werden. Die Ergebnisse von Zetapotentialmessungen der arzneistofffreien Systeme sind, zusammen mit den pH-Werten, in Tabelle 4.10 aufgeführt.

Tabelle 4.10: Zetapotential ζ [mV] (n=9) und pH-Wert der Nanosuspensionen.

System	ζ	pH
15 % (m/m) SRMS100	0,42 $\pm 1,19$	6,37
15 % (m/m) SRMS142	0,01 $\pm 0,84$	6,36

Das Zetapotential beider Systeme liegt bei einem Wert von null, was bei Verwendung des nichtionischen O/W-Emulgators Polysorbat 80 und des amphoteren Phospholipids Lecithin erwartet werden kann. Einhergehend mit einem neutralen Potential in der Scherebene ist eine Annäherung von Partikeln aufgrund mangelnder Abstoßungskräfte leicht möglich und im Anschluss daran die Gefahr der Agglomeration gegeben [Martin et al. 1987].

Eine deutliche Instabilität der Nanosuspensionen, d.h. eine Bildung sehr großer Agglomerate, tritt innerhalb der Lagerzeit von bis zu 20 Wochen aber nicht auf, sodass prinzipiell stabile Systeme vorliegen mit der Neigung, relativ kleine Agglomerate aus wenigen Einzelpartikeln zu bilden.

Eine, lediglich mit S100 als Lipidmatrix hergestellte, Nanosuspension gleicher Konzentration (15 % (m/m)) besitzt mit $-5,20 \pm 0,46$ mV ($n=3$) ein geringfügig negatives Zetapotential. Diese negative Ladung scheint durch den Einsatz von Lecithin kompensiert zu werden, wobei Lecithinmoleküle, die sich in der Partikeloberfläche befinden, mit der positiv geladenen Trimethylammoniumgruppe des Cholinrests nach außen orientiert vorliegen könnten.

Der pH-Wert der arzneistofffreien Nanosuspensionen liegt mit etwa 6,4 etwas außerhalb des schmerzfreien Toleranzbereichs des Auges, der zwischen 7,0 und 9,0 liegt [Dolder 1990], wobei erst pH-Werte von kleiner 6,0 als schmerzhaft gelten [Bauer et al. 2002]. Im Selbstversuch mit vier Probanden können keine, durch die beiden Nanosuspensionen verursachten, Reizungen festgestellt werden.

4.4.6 Rheologische Untersuchungen carbopolfreier und -haltiger Nanosuspensionen

Rheologische Untersuchungen werden mit den originären 15 %igen (m/m) Nanosuspensionen, unter Zusatz von 0,05 % (m/m) Carbopol 980 sowie unter Zusatz von 0,05 % (m/m) Carbopol 980 und anschließender Einstellung der Systeme auf pH 7,4 durchgeführt. Der Zusatz der Polyacrylsäure hat eine unvermeidbare Viskositätserhöhung zur Folge, soll aber dazu dienen, eine Mucoadhäsivität und damit eine längere Verweildauer am Applikationsort Auge zu erzielen. Carbopol besitzt mucoadhäsive Eigenschaften [Park und Robinson 1987] und wird in der angegebenen Konzentration verwendet, da diese sich klumpenfrei dispergieren lässt und noch eine niedrige Viskosität der Suspension gewährleistet.

In Tabelle 4.11 ist zunächst der Einfluss des Polymers auf die Partikelgrößen der Nanosuspensionen wiedergegeben. Durch den Zusatz von CP980 kommt es zunächst zu einer Erhöhung der Partikelgrößen von 122 auf 142 nm (SRMS100) bzw. von 87 auf 107 nm (SRMS142). Dies kann einerseits mit einer erhöhten Neigung der Partikel zur Agglomeration erklärt werden, andererseits kann die Polyacrylsäure bei Anlagerung an die Partikel durch Bildung einer vergrößerten, fixierten Hydratations-schicht eine Erhöhung des hydrodynamischen Partikeldurchmessers hervorrufen. Auch der Polydispersitätsindex ist nach Zusatz des Polymers erhöht.

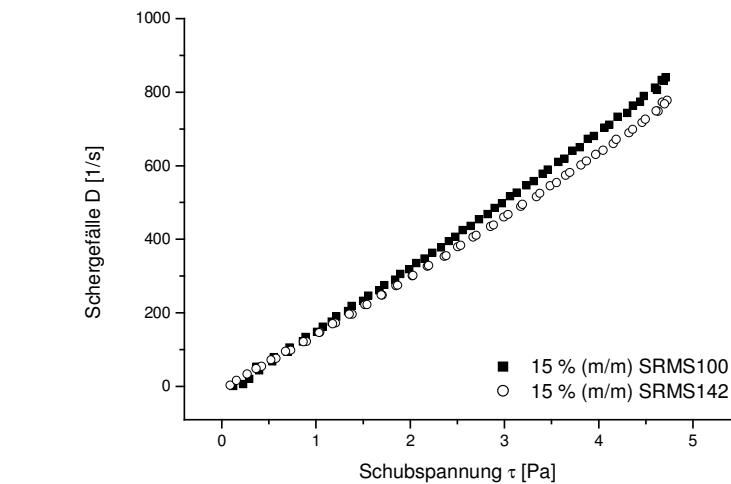
Eine Neutralisation führt bei dem SRMS100-haltigen System zu einer Erniedrigung des z-average bei gleichbleibendem PI, wogegen das SRMS142-System gleiche Partikelgrößen aufweist. Da die Standardabweichungen bei den Nanosuspensionen mit SRMS100 jedoch auch stark erhöht gegenüber dem SRMS142-System sind, ist fraglich, ob diese signifikante Reduktion der Partikelgrößen reproduzierbar ist oder auf einer unkorrekten Probennahme beruht.

Tabelle 4.11: Mittlere Partikelgrößen (z-average) [nm] und Polydispersitätsindices (PI) der carbopolfreien und -haltigen Nanosuspensionen (n=6).

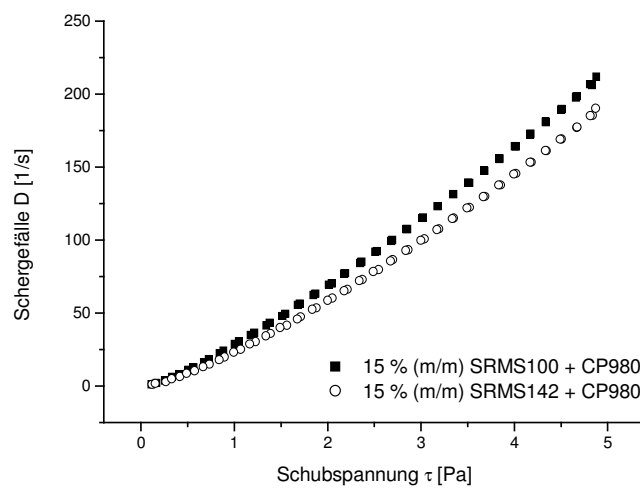
System	z-average	PI
15 % (m/m) SRMS100	122,4 ± 4,3	0,223 ± 0,010
15 % (m/m) SRMS100 + 0,05 % (m/m) CP980	142,2 ± 14,7	0,296 ± 0,039
15 % (m/m) SRMS100 + 0,05 % (m/m) CP980 pH 7,4	116,1 ± 11,8	0,302 ± 0,049
15 % (m/m) SRMS142	86,7 ± 4,1	0,126 ± 0,007
15 % (m/m) SRMS142 + 0,05 % (m/m) CP980	107,1 ± 3,3	0,245 ± 0,049
15 % (m/m) SRMS142 + 0,05 % (m/m) CP980 pH 7,4	109,2 ± 3,9	0,272 ± 0,029

4.4.6.1 Rotationsviskosimetrie

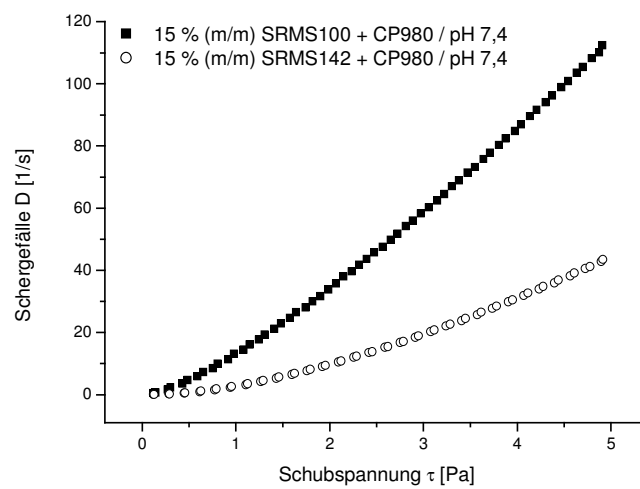
Die verschiedenen Systeme werden rotationsviskosimetrisch auf ihre rheologischen Eigenschaften, d.h. ihr Fließverhalten und ihre Viskosität untersucht. Abbildung 4.34 zeigt die Rheogramme der Systeme, Abbildung 4.35 die zugehörigen Viskogramme.



a)



b)



c)

Abbildung 4.34: Rheogramme der a) originären Nanosuspensionen b) Nanosuspensionen mit 0,05 % (m/m) CP980 c) Nanosuspensionen mit 0,05 % (m/m) CP980 (pH 7,4).

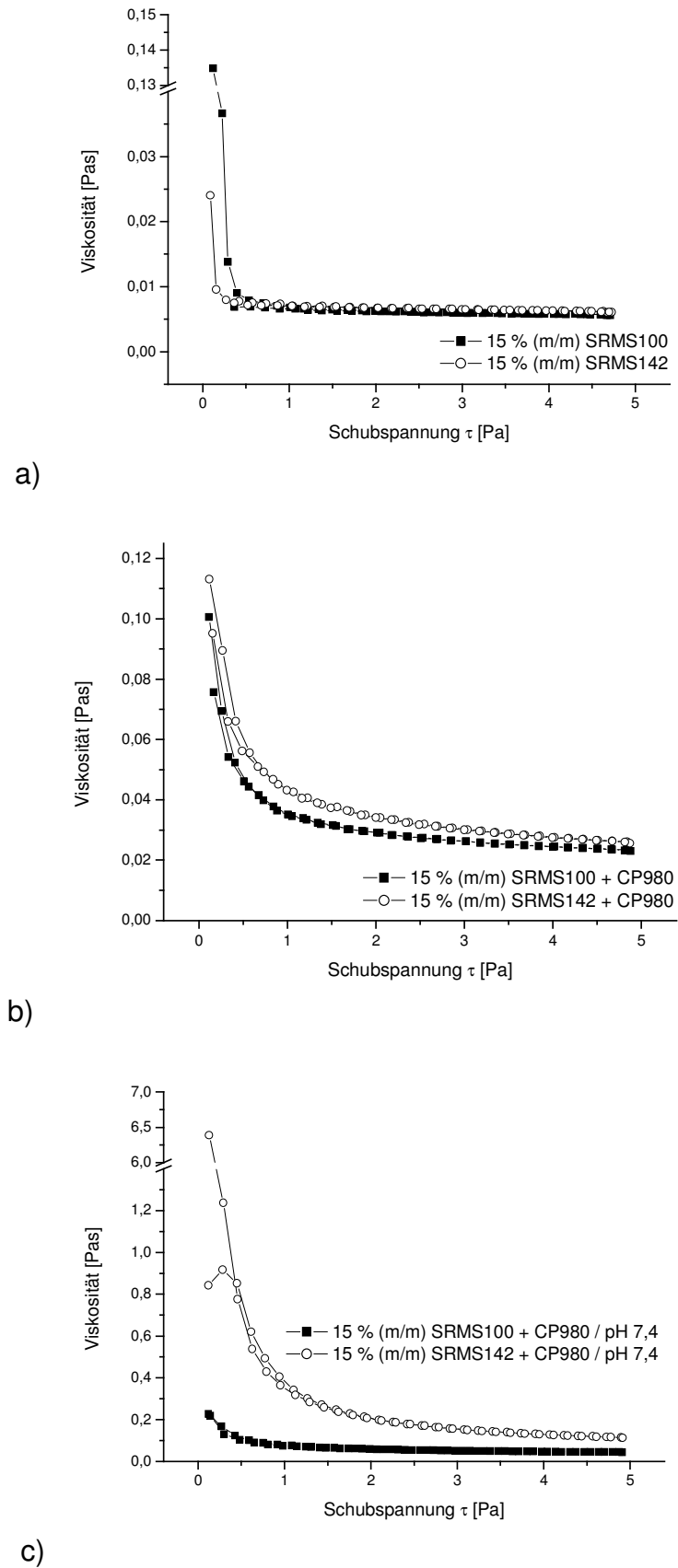


Abbildung 4.35: Viskogramme der a) originären Nanosuspensionen b) Nanosuspensionen mit 0,05 % (m/m) CP980 c) Nanosuspensionen mit 0,05 % (m/m) CP980 (pH 7,4).

Die originären Nanosuspensionen weisen nahezu idealviskose Fließeigenschaften auf, während die carbopolhaltigen Systeme eine ausgeprägte Pseudoplastizität zeigen. Die Nanopartikel sind zwar, wie in den Abschnitten 4.4.1 und 4.4.2 beschrieben, von anisometrischer Form, eine Orientierung in Scherrichtung scheint aber keine große Kraft zu erfordern. Im Gegensatz dazu müssen sich die Polyacrylsäuremoleküle zunächst ausrichten, was eine Verringerung der Viskosität zur Folge hat (Abbildung 4.35). Die „Fließgrenzen“ aller Systeme sind vernachlässigbar gering (0,15-0,23 Pa) und eher messtechnischer Natur. Eine Beeinflussung durch den Zusatz von CP980 kann nicht beobachtet werden. Zum Vergleich der verschiedenen Systeme wird deren momentane Viskosität η_i bestimmt, die Werte sind in Tabelle 4.12 angegeben.

Tabelle 4.12: Momentane Viskosität η_i [mPas] der Systeme bei $\tau = 2$ Pa ($n=6$).

System	η_i
15 % (m/m) SRMS100	5,99 $\pm 0,36$
15 % (m/m) SRMS100 + 0,05 % (m/m) CP980	24,34 $\pm 3,91$
15 % (m/m) SRMS100 + 0,05 % (m/m) CP980 pH 7,4	44,07 $\pm 9,53$
15 % (m/m) SRMS142	6,52 $\pm 0,37$
15 % (m/m) SRMS142 + 0,05 % (m/m) CP980	28,18 $\pm 5,77$
15 % (m/m) SRMS142 + 0,05 % (m/m) CP980 pH 7,4	158,26 $\pm 33,21$

Die Nanosuspensionen besitzen mit einer Viskosität von ca. 6 mPas einen dünnflüssigen Charakter. Nach Zusatz von 0,05 % (m/m) CP980 kann eine deutliche Viskositätssteigerung auf 20-30 mPas aufgrund des zusätzlichen, verknäuelten Polymers beobachtet werden, wobei sowohl bei den carbopolfreien als auch bei den carbopolhaltigen Suspensionen unter Berücksichtigung der Standardabweichungen keine Unterschiede zwischen SRMS100- und SRMS142-System erkannt werden können. Eine nochmalige Erhöhung der Viskosität findet nach Neutralisation der Systeme statt. Dabei weist das neutralisierte SRMS100-System eine Viskosität von 44 mPas auf, während die SRMS142-haltige Nanosuspension dann eine Viskosität von nahezu 160 mPas besitzt. Eine Erklärung für diesen Befund kann nicht gegeben werden,

da sich die beiden Nanosuspensionen in der Regel sehr ähnlich verhalten. Da sich die Partikelgrößen der neutralisierten Nanosuspensionen auf einem Niveau befinden (Tabelle 4.11) kann ein Teilchengrößeneffekt ausgeschlossen werden.

4.4.6.2 Oszillationsrheologische Untersuchungen mucoadhäsiver Effekte

Zur Beurteilung mucoadhäsiver Eigenschaften der originären und carbopolhaltigen Nanosuspensionen werden oszillationsrheologische Untersuchungen im linear viskoelastischen Bereich durchgeführt. Von den, in Abschnitt 3.2.16 beschriebenen, 1:1 (m/m) Mischungen System/MUC, System/SLF und MUC/SLF werden die rheologischen Parameter elastischer Modul (oder Speichermodul) G' , viskoser Modul (oder Verlustmodul) G'' und Phasenwinkel δ ermittelt.

Dabei stellt δ die Phasenverschiebung zwischen maximaler aufgegebener Schubspannung und maximaler Deformation dar und ist ein Parameter für das Verhältnis von elastischen zu viskosen Anteilen des Systems [Rose 1999]. Ist $\delta < 45^\circ$, so überwiegen die elastischen Anteile, bei $\delta > 45^\circ$ überwiegen hingegen die viskosen Anteile. Für G' und G'' gilt

$$G' = \frac{\tau_0}{\chi_0} \cdot \cos\delta \quad (\text{Gl. 4.10})$$

und

$$G'' = \frac{\tau_0}{\chi_0} \cdot \sin\delta \quad (\text{Gl. 4.11})$$

wobei τ_0 die Schubspannung und χ_0 die Deformation des Systems darstellt. Aus den Parametern G' und G'' der untersuchten Mischungen wird entsprechend der Gleichungen

$$MAI_{(G')} = G'_{(\text{System/MUC})} - [G'_{(\text{System/SLF})} + G'_{(\text{MUC/SLF})}] \quad (\text{Gl. 4.12})$$

$$MAI_{(G'')} = G''_{(\text{System/MUC})} - [G''_{(\text{System/SLF})} + G''_{(\text{MUC/SLF})}] \quad (\text{Gl. 4.13})$$

ein G' bzw. G'' basierter mucoadhäsiver Index $MAI_{(G')}$ bzw. $MAI_{(G'')}$ berechnet [Rossi et al. 1995].

Für die Untersuchungen wird unbehandeltes Mucin aus dem Schweinemagen verwendet, da okulares Mucin nicht kommerziell verfügbar ist [Ceulemans und Ludwig

2002]. Die rheologischen Eigenschaften von okularem Mucin werden hauptsächlich durch das gelbildende MUC5AC Mucin bestimmt, das auch für das rheologische Verhalten von gastrischem Mucin verantwortlich ist [Argüeso und Gipson 2001]. Darüber hinaus wird durch Verwendung einer Salzlösung (simulierte Tränenflüssigkeit SLF) die molekulare Konformation des gastrischen Mucins derjenigen des okularen Mucins so gut wie möglich angenähert [Van Haeringen 1981].

Ein System besitzt dann mucoadhäsive Eigenschaften, wenn G' oder G'' der System/MUC-Mischungen überadditiv gegenüber den Einzelkomponenten System/SLF und MUC/SLF gesteigert wird, da dadurch verstärkte Interaktionen zwischen dem System und Mucin nachgewiesen sind [Rossi et al. 1995]. Dies ist der Fall, wenn nach den Gleichungen 4.12 bzw. 4.13 ein positiver MAI berechnet wird.

Da der elastische Modul G' sehr klein ist (Größenordnung 10^{-4} - 10^{-5} Pa), resultieren bei gegebener Empfindlichkeit des Rheometers erhebliche messtechnische Schwankungen und damit große Standardabweichungen. Daher wird lediglich ein G'' basierter $MAI_{(G'')}$ kalkuliert.

Da die Phasenwinkel δ der 1:1 (m/m) Mischungen der Systeme mit MUC im Bereich von $86,3^\circ$ und $87,8^\circ$ liegen, überwiegen somit die viskosen Anteile deutlich. Entsprechend ist, im Vergleich zum elastischen Modul G' , der viskose Modul G'' sehr viel größer und die Schwankungen dieses Parameters sind geringer. Ein Phasenwinkel $\delta > 45^\circ$ repräsentiert eine Polymerlösung, in der das Polymer physikalisch verknäuelte und nicht als Netzwerk vorliegt [Ferry 1970]. Die niedrige Polymerkonzentration von 0,05 % (m/m) ist die Ursache für das Ausbleiben der Ausbildung von Sekundärbindungen bzw. der Ausbildung eines Netzwerks.

In Tabelle 4.13 sind die viskosen Module der untersuchten Mischungen dargestellt, Tabelle 4.14 zeigt die daraus kalkulierten mucoadhäsiven Indices. Ein positiver $MAI_{(G'')}$ kann bei allen untersuchten Systemen berechnet werden. Dies beweist, dass nicht nur die carbopolhaltigen Nanosuspensionen vermehrte Interaktionen mit dem Mucin eingehen und so für einen mucoadhäsiven Effekt sorgen, sondern, dass auch die beiden originären Nanosuspensionen vermehrt mit Mucin interagieren. Nach Zusatz von CP980 ist keine eindeutige Steigerung des $MAI_{(G'')}$ gegenüber dem carbopolfreien System festzustellen.

Neben den absoluten Werten für die mucoadhäsiven Indices kann darüber hinaus die relative Erhöhung von G'' gegenüber der Summe der Einzelkomponenten gemäß der Gleichung

$$\text{rel. Erhöhung } (G'') = \frac{\text{MAI}_{(G'')}}{[G''_{(\text{System/SLF})} + G''_{(\text{MUC/SLF})}]} \cdot 100 \quad (\text{Gl. 4.14})$$

bestimmt werden. Darunter ist der $\text{MAI}_{(G'')}$, bezogen auf die Einzelkomponenten zu verstehen. Diese Werte sind ebenfalls in Tabelle 4.14 dargestellt. Die relative Erhöhung von G'' liegt in einem Bereich von etwa 200-300 %, was den signifikanten Anstieg von G'' bei der Interaktion der Systeme mit Mucin unterstreicht.

Tabelle 4.13: Viskoser Modul G'' [mPa] der untersuchten Mischungen (n=6).

System	1:1 (m/m) mit MUC	1:1 (m/m) mit SLF
15 % (m/m) SRMS100	12,89 ± 2,28	1,38 ± 0,47
15 % (m/m) SRMS100 + 0,05 % (m/m) CP980	12,64 ± 1,91	2,50 ± 0,89
15 % (m/m) SRMS100 + 0,05 % (m/m) CP980 pH 7,4	9,76 ± 1,49	1,81 ± 0,82
15 % (m/m) SRMS142	10,01 ± 0,99	0,94 ± 0,11
15 % (m/m) SRMS142 + 0,05 % (m/m) CP980	13,12 ± 2,26	1,22 ± 0,35
15 % (m/m) SRMS142 + 0,05 % (m/m) CP980 pH 7,4	9,26 ± 1,01	0,98 ± 0,18
MUC	-	2,05 ± 0,10

Tabelle 4.14: Kalkulation des $\text{MAI}_{(G'')}$ [mPa] und der relativen Erhöhung von G'' [%].

System	$\text{MAI}_{(G'')}$	rel. Erhöhung von G''
15 % (m/m) SRMS100	9,45	275
15 % (m/m) SRMS100 + 0,05 % (m/m) CP980	8,09	178
15 % (m/m) SRMS100 + 0,05 % (m/m) CP980 pH 7,4	5,89	152
15 % (m/m) SRMS142	7,02	235
15 % (m/m) SRMS142 + 0,05 % (m/m) CP980	9,84	301
15 % (m/m) SRMS142 + 0,05 % (m/m) CP980 pH 7,4	6,23	205

Verantwortlich für mucoadhäsive Interaktionen sind charakteristische funktionelle Gruppen in den Kohlenhydratseitenketten des Mucins. Dies sind Sulfatgruppen sowie Sialinsäuregruppen (N-Acetylneuraminsäure) [Argüeso und Gipson 2001], wobei

Sialomucine polyanionischer Art sind [Gobert et al. 1984]. Mucoadhäsive Effekte der originären Systeme können im Zusammenhang mit der Lokalisation von Lecithinmolekülen in der Oberfläche der Lipidnanopartikel gesehen werden. Wie in Abschnitt 4.4.5 bereits beschrieben, scheint sich in der Oberfläche befindliches Phospholipid mit seiner positiven Trimethylammoniumgruppe nach außen zu orientieren, besitzt dann entsprechende Affinität zu dem Mucin und kann mit diesem wechselwirken. Wie die Phasenwinkel zeigen, findet dabei aber keine Ausbildung eines Netzwerks aus Mucin und Nanopartikeln statt.

4.4.7 Zusammenfassende Diskussion der Ergebnisse der Charakterisierung arzneistofffreier SRMS basierter Nanosuspensionen

Mit Hilfe der Transmissionselektronenmikroskopie kann gezeigt werden, dass die Herstellung von Nanosuspensionen auf Basis erstarrter invers mizellarer Lösungen nach der entwickelten Methode zu anisometrischen, plättchenartigen Nanopartikeln von etwa 30-130 nm Durchmesser führt. Die Bildung von Liposomen aufgrund einer Lecithindiffusion in die wässrige Phase und das Auftreten unterkühlter Schmelzen kann somit ausgeschlossen werden. Die Anisometrie der Partikel wird bestätigt durch kapillarviskosimetrische Untersuchungen und die Bestimmung der intrinsischen Viskosität, die zeigt, dass die Partikel ein Halbachsenverhältnis von 10-20 besitzen.

Mit der Dynamischen Differenzkalorimetrie kann ein Schmelzvorgang der Nanopartikel detektiert werden, der deren Feststoffcharakter unterstreicht. Der Schmelzvorgang findet dabei 8-9 °C unterhalb des Schmelzpunktes der Bulkmaterialien SRMS100 und SRMS142 statt, was in den kolloidalen Abmessungen der Partikel begründet liegt. Ihr großes Oberflächen/Volumen-Verhältnis führt zu einem endothermen Schmelzvorgang bei niedrigeren Temperaturen.

Dass die Schmelzpunktdepression nicht auf einer niedriger schmelzenden α -Modifikation beruht, zeigen die Ergebnisse röntgenographischer Untersuchungen, nach denen die Nanopartikel, im Gegensatz zu den Bulkmaterialien, sogar in einer stabilen β -Modifikation rekristallisieren.

Ein Anstieg der Schmelzübergangstemperatur der Nanosuspensionen um 1-2 °C in den ersten Tagen nach Herstellung geht einher mit einem Anstieg der Partikelgrößen der Systeme. Dieser Anstieg ist wahrscheinlich auf eine Zusammenlagerung der plättchenartigen Partikel zu „geldstapelartigen“ Agglomeraten zurückzuführen. Eine Agglomeration ist dabei durch ein neutrales Zetapotential begünstigt.

Wie rotationsviskosimetrisch festgestellt wird, zeigen die originären Nanosuspensionen idealviskoses Fließverhalten mit einer niedrigen Viskosität von etwa 6 mPas. Nach Zusatz von Carbopol 980 kommt es zur Ausbildung eines pseudoplastischen Fließverhaltens, das sich nach Einstellen eines physiologischen pH-Wertes noch ausgeprägter präsentiert. Ursache könnte die Ausrichtung der Polyacrylsäuremoleküle entlang der Scherrichtung sein. Die Viskosität steigt nach CP980-Zusatz auf Werte von 20-30 mPas an. Eine pH-Erhöhung auf 7,4 führt zu einer weiteren Viskositätserhöhung, wobei eine, in Relation zum SRMS100-System, unverhältnismäßige Steigerung bei der SRMS142-Nanosuspension nicht erklärt werden kann.

Die Partikelgrößen nehmen durch das CP980 in gewissem Maße zu. Einerseits kann das Polymer nach Anlagerung an die Partikel den hydrodynamischen Durchmesser erhöhen (Abbildung 4.36), andererseits zeigt das Polymer (0,05 % (m/m)) einen z-average von 384 ± 107 nm ($n=3$) bei sehr niedriger Streurate. Das bedeutet, dass der z-average der carbopolhaltigen Suspension erhöht würde, ohne dass eine zweite Verteilung erkennbar ist. Die Streurate der Nanopartikel ist sehr viel höher und die Suspensionen müssen entsprechend zur Partikelgrößenbestimmung verdünnt werden, während 0,05 % (m/m) CP980 unverdünnt untersucht werden kann. Eine Verschiebung des gemittelten Partikeldurchmessers zu leicht höheren Werten bei gleichzeitiger Erhöhung des Polydispersitätsindex (vgl. Tabelle 4.11) könnte somit erklärt werden.

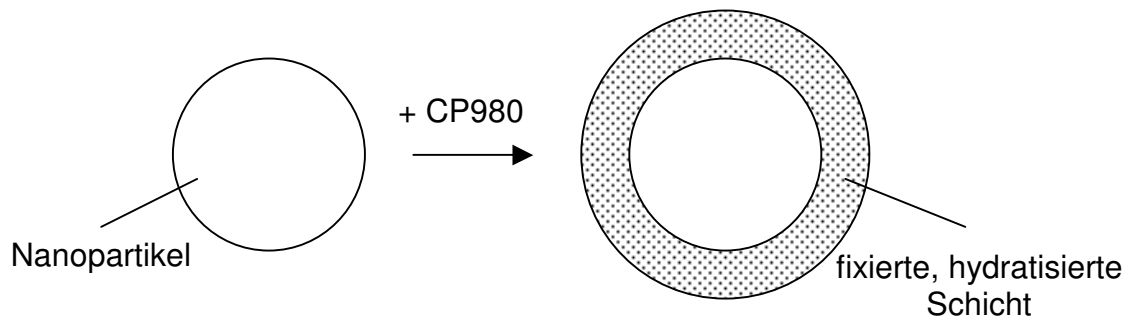


Abbildung 4.36: Vergrößerung des Partikeldurchmessers durch CP980 (Hypothese).

Die oszillationsrheologischen Untersuchungen verschiedener Mischungen mit Mucin und simulierter Tränenflüssigkeit beweisen, dass bereits die beiden originären Nanosuspensionen verstärkte Interaktionen mit einer Mucin-Dispersion aufweisen. Dies wird durch einen, im Vergleich zur Summe der Einzelkomponenten, signifikanten überadditiven Anstieg des viskosen Moduls G'' einer System-Mucin-Mischung festgestellt. Durch das per se mucoadhäsive Carbopol können die mucoadhäsiven Effekte nicht weiter gesteigert werden.

Eine Mucoadhäsivität der Nanosuspensionen kann auf, in der Oberfläche der Partikel vorhandenen, Lecithinmolekülen beruhen, die mit geeigneten funktionellen Gruppen des Mucins wechselwirken können.

4.5 Arzneistoffbeladung und Charakterisierung arzneistoffhaltiger SRMS basierter Nanosuspensionen

Der folgende Abschnitt befasst sich mit der Beladung der SRMS basierten Nanosuspensionen mit den drei untersuchten Arzneistoffen Pilocarpin-Base, Estradiol und Hydrocortison und der anschließenden Charakterisierung der arzneistoffhaltigen Systeme. Hauptaugenmerk wird dabei auf die Beladungskapazität der Nanopartikel sowie auf die Arzneistoffliberation aus den Systemen und die Permeation der Arzneistoffe durch ein humanes, organotypisches Cornea-Konstrukt gelegt.

4.5.1 Herstellung arzneistoffhaltiger Nanosuspensionen

Bei der Herstellung arzneistoffhaltiger Nanosuspensionen ist allen untersuchten Arzneistoffen gemein, dass sie zunächst in der invers mizellaren Schmelze der SRMS100 bzw. SRMS142 solubilisiert werden. Diese Lipidphase wird nach Erstarren und Mörsern in vordispersierter Form unter den, in Abschnitt 3.2.4 beschriebenen, optimierten Bedingungen hochdruckhomogenisiert.

4.5.1.1 Pilocarpin-Base

Ausgehend von der, in Abschnitt 4.2.2.2 festgestellten, in der Schmelze der SRMS maximal solubilisierbaren, Pilocarpinkonzentration von 7,0 % (m/m) (SRMS100) bzw. 6,5 % (m/m) (SRMS142), wird zur Herstellung pilocarpinhaltiger Nanosuspensionen eine Lipidmatrix verwendet, die 6,5 % (m/m) Arzneistoff enthält. Um eine Gesamtkonzentration von 1 % (m/m) Pilocarpin zu erhalten wird die, in Tabelle 4.15 beschriebene, Rezeptur dem Herstellungsprozess unterworfen.

Tabelle 4.15: Basisrezeptur der pilocarpinhaltigen Nanosuspensionen.

Komponente	Anteil [% (m/m)]
SRMS (inkl. 6,5 % (m/m) PB)	15,4
PS80	3,1
Sorbitol	3,9
Thiomersal	0,005
Aqua. bidest.	ad 100,0

Die Partikelgrößen (z-average) der entstehenden Nanosuspensionen liegen mit 57-100 nm in einem zufriedenstellenden Bereich und die Polydispersitätsindizes sind kleiner als 0,3. Die Systeme zeigen makroskopisch keine Auffälligkeiten, im Vergleich zu den arzneistofffreien Systemen.

Es kann jedoch beobachtet werden, dass die Nanosuspensionen nach Homogenisation hyperton sind (340-350 mosmol/kg) und eine pH-Verschiebung zum Basischen (pH 8,4) zeigen, was die Stabilität des Arzneistoffs verschlechtert [Dolder 1990]. Dies ist auf eine Diffusion eines gewissen Anteils des Pilocarpins in die wässrige Außenphase zurückzuführen (vgl. Abschnitt 4.5.2), weswegen eine Anpassung der Rezeptur nach Tabelle 4.16 erfolgt. Verwendet wird nun ein Phosphatpuffer pH 5,4 [Dolder 1990], womit ein pH von 6,8 erreicht wird, der allerdings im Hinblick auf Stabilitätsaspekte immer noch nicht optimal ist.

Tabelle 4.16: Optimierte Rezeptur der pilocarpinhaltigen Nanosuspensionen.

Komponente	Anteil [% (m/m)]
SRMS (inkl. 6,5 % (m/m) PB)	15,4
PS80	3,1
Sorbitol	0,8
Thiomersal	0,005
Phosphatpuffer pH 5,4	ad 100,0

Die nachfolgenden Untersuchungen erfolgen, mit Ausnahme der Bestimmung der Beladungskapazität, mit den pufferhaltigen Nanosuspensionen.

4.5.1.2 Estradiol

Wie beim Pilocarpin wird bei der Partikelbeladung mit Estradiol von der, in Abschnitt 4.2.2.2 festgestellten, solubilisierbaren Estradiolkonzentration von 10,0 % (m/m) (SRMS100) bzw. 8,5 % (m/m) (SRMS142) ausgegangen und zunächst eine Lipidmatrix mit 8,0 % (m/m) Arzneistoff verwendet. Ein Lipidanteil von 6,25 % (m/m) ergibt entsprechend eine Gesamtkonzentration von 0,5 % (m/m) Estradiol in den Nanosuspensionen.

Diese Konzentration führt nach dem Homogenisierungsprozess zu großen Partikelgrößen im Mikrometerbereich, was auf ausgefälltes Estradiol zurückzuführen ist. Zudem kommt es zur Bildung eines estradiolhaltigen Sediments (Identifizierung per DC).

Eine mögliche Interaktion des Arzneistoffs mit der phenolischen Gruppe des Thiomersals kann dabei ausgeschlossen werden, da die Sedimentbildung auch ohne das Konservierungsmittel stattfindet. Als Ursache für das Ausfällen des Estradiol ist vielmehr die kaum gegebene Wasserlöslichkeit des Arzneistoffs von etwa 20 µg/ml [Peters 2000] zu nennen. Tritt während der Hochdruckhomogenisation der Arzneistoff in der Tröpfchengrenzfläche mit der wässrigen Außenphase in Kontakt, so werden in der Nähe des Partikels übersättigte Lösungen gebildet. Ein Austritt eines gewissen Anteils des Estradiols ist wahrscheinlich, da die Konzentration in den Partikeln sehr hoch ist und bei partikulären Strukturen andere Gegebenheiten vorliegen als im Bulk. Eine weitere Erklärung für das Ausfällen ist die Kristallisation der Partikel in der stabilen β -Modifikation, wie in Abschnitt 4.4.3.2 erläutert. Da diese Modifikation eine höhere Ordnung als die, im Bulkmaterial vorliegende, β' -Modifikation aufweist, ist die Löslichkeit des Arzneistoffs in dispergierter SRMS, im Vergleich zum Bulk, weiter erniedrigt.

Nach diesem Befund wird die Estradiolkonzentration in der Lipidmatrix bzw. im Gesamtsystem reduziert, bis Partikel im erwarteten Größenbereich mit enger Verteilung erhalten werden und kein Sediment mehr auftritt. Die Versuche sind in Tabelle 4.17 aufgeführt.

Tabelle 4.17: Optimierung der estradiolhaltigen Nanosuspensionen.

EST [% (m/m)] in SRMS	SRMS [% (m/m)] in Nanosuspensionen	EST [% (m/m)] gesamt	Bewertung Größe / Sediment
8,0	6,25	0,50	negativ
3,5	14,3	0,50	negativ
2,0	12,5	0,25	negativ
1,5	13,3	0,20	negativ
1,0	15,0	0,15	negativ
0,7	14,3	0,10	positiv

Eine Verringerung des Estradiol/SRMS-Verhältnisses führt nicht zu zufriedenstellenden Ergebnissen. Bezüglich z-average, Polydispersitätsindex und nicht vorhandenem Sediment werden akzeptable Nanosuspensionen erst nach Reduktion der Estradiolkonzentration auf 0,7 % (m/m) in der Lipidmatrix bzw. 0,1 % (m/m) im Gesamtsystem erreicht. Die Partikelgrößen betragen 57-131 nm und die Polydispersitätsindices sind kleiner als 0,3. Die endgültige Zusammensetzung der estradiolhaltigen Nanosuspensionen ist in Tabelle 4.18 wiedergegeben.

Tabelle 4.18: Endgültige Rezeptur der estradiolhaltigen Nanosuspensionen.

Komponente	Anteil [% (m/m)]
SRMS (inkl. 0,7 % (m/m) EST)	14,3
PS80	2,9
Sorbitol	3,9
Thiomersal	0,005
Aqua. bidest.	ad 100,0

Diese Rezeptur ist nach der Hochdruckhomogenisation isoton, was auf die nahezu vollständige Verkapselung des Arzneistoffs hinweist. Außerdem liegt der pH-Wert der Suspensionen mit 6,2-6,4 in dem Bereich, den auch die arzneistofffreien Systeme aufweisen (vgl. Abschnitt 4.4.5).

4.5.1.3 Hydrocortison

Aufgrund der Probleme bei der Herstellung der estradiolhaltigen Nanosuspensionen wird bei der Herstellung hydrocortisonhaltiger Systeme von vornherein eine wesentlich niedrigere Arzneistoffkonzentration als die, in Abschnitt 4.2.2.2 ermittelte, verwendet. Eingesetzt werden 3,0 % (m/m) Hydrocortison in der SRMS. In Anlehnung an Fertigarzneimittel zur ophthalmologischen Anwendung wird eine Endkonzentration von 0,5 % (m/m) Hydrocortison angestrebt [Rote Liste 2004] und entsprechend die, in Tabelle 4.19 angegebene, Rezeptur dem Herstellungsprozess unterworfen.

Tabelle 4.19: Rezeptur der hydrocortisonhaltigen Nanosuspensionen.

Komponente	Anteil [% (m/m)]
SRMS (inkl. 3,0 % (m/m) HC)	16,7
PS80	3,3
Sorbitol	3,8
Thiomersal	0,005
Aqua. bidest.	ad 100,0

Es resultieren Systeme, die, im Vergleich zu den arzneistofffreien Systemen, makroskopisch keine Auffälligkeiten zeigen. Die Partikelgrößen (z-average) der entstehenden Nanosuspensionen sind mit 44-134 nm akzeptabel und die Polydispersitätsindizes sind mit Werten von unter 0,3 ebenfalls zufriedenstellend, sodass die Rezeptur für die weiteren Untersuchungen unverändert verwendet wird. Die Nano-

suspensionen besitzen einen, den arzneistofffreien Systemen entsprechenden, pH von 6,3-6,4 und sind auch nach der Herstellung isoton. Dies weist wiederum auf eine geringe Arzneistoffdiffusion aus den Partikeln hin.

4.5.2 Charakterisierung arzneistoffhaltiger Nanosuspensionen

Zur Evaluierung der Lokalisation inkorporierter Arzneistoffe wird das Zetapotential der arzneistoffhaltigen Systeme bestimmt. Die Nanopartikel werden elektronenmikroskopisch visualisiert. Ein wesentlicher Aspekt bei der Arzneistoffbeladung von Nanopartikeln ist die Beladungskapazität, die ebenfalls ermittelt wird.

4.5.2.1 Bestimmung des Zetapotentials arzneistoffhaltiger Nanosuspensionen

Die Bestimmung des Zetapotentials der arzneistoffhaltigen Nanosuspensionen (Tabelle 4.20) zeigt keine Unterschiede, im Vergleich zu den arzneistofffreien Systemen (vgl. Abschnitt 4.4.5). In Anbetracht der Standardabweichungen ist die leichte Erhöhung bei den pilocarpinhaltigen Systemen nicht relevant. Aus diesem Grund kann ein Einfluss der Arzneistoffe auf die Oberflächenladung der Nanopartikel ausgeschlossen werden.

Tabelle 4.20: Zetapotential ζ [mV] der arzneistoffhaltigen Nanosuspensionen (n=3).

Arzneistoff	SRMS100 Nanosuspension	SRMS142 Nanosuspension
Pilocarpin-Base	0,90 $\pm 0,78$	1,10 $\pm 0,79$
Estradiol	-0,77 $\pm 0,06$	0,17 $\pm 0,21$
Hydrocortison	-0,67 $\pm 0,06$	-0,80 ± 0

4.5.2.2 Elektronenmikroskopische Untersuchungen arzneistoffhaltiger Nanosuspensionen

Auch bei elektronenmikroskopischer Betrachtung der arzneistoffhaltigen Systeme können keine Unterschiede zu den arzneistofffreien Nanosuspensionen (vgl. Abschnitt 4.4.1) beobachtet werden. In Abbildung 4.37 sind typische Aufnahmen von Nanosuspensionen mit den drei untersuchten Arzneistoffen dargestellt.

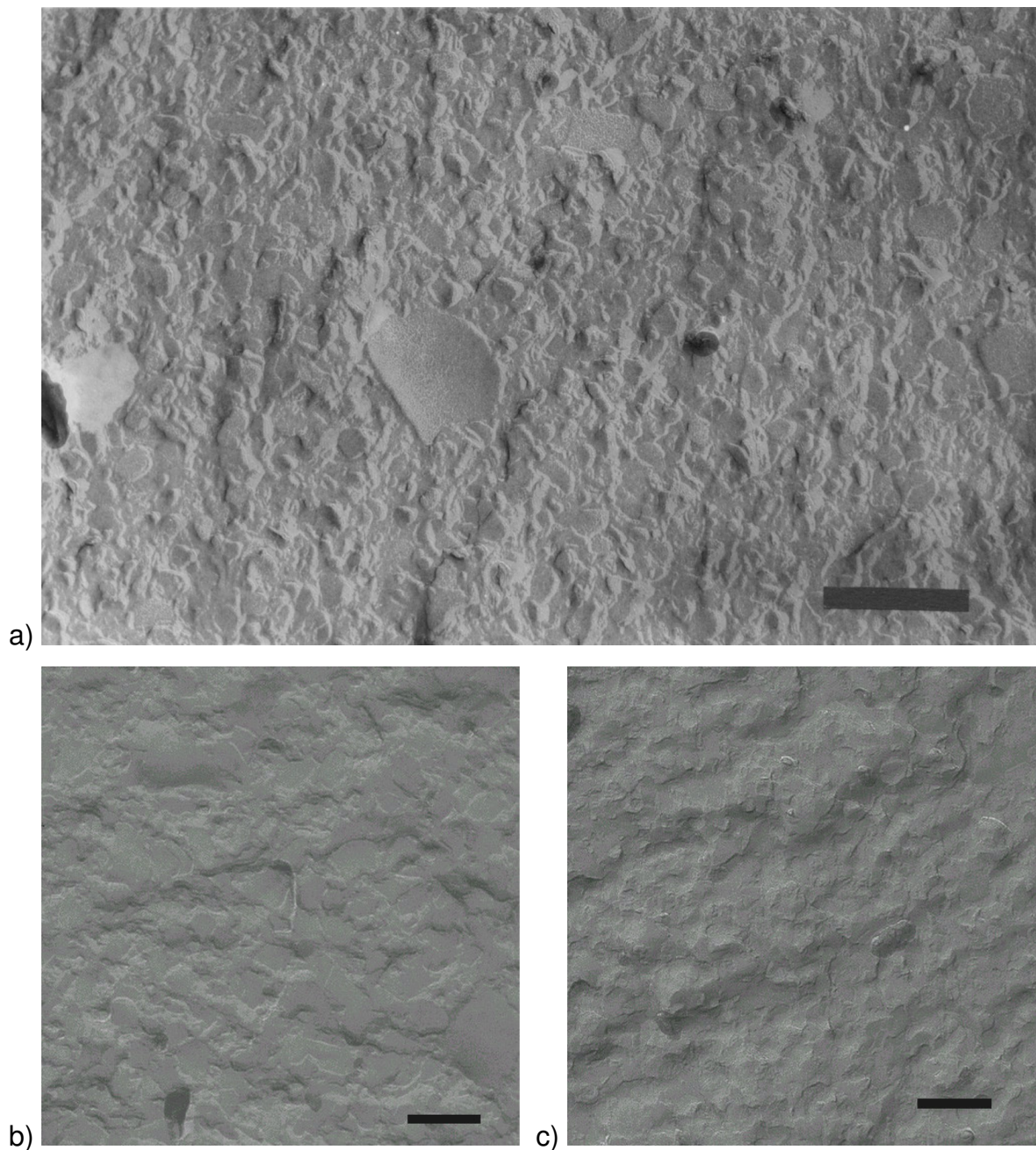


Abbildung 4.37: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von a) 15,4 % (m/m) SRMS142, 1 % (m/m) PB (Balken = 303 nm) b) 14,3 % (m/m) SRMS142, 0,1 % (m/m) EST (Balken = 314 nm) c) 16,7 % (m/m) SRMS100, 0,5 % (m/m) HC (Balken = 192 nm).

Wie bei den Suspensionen ohne Arzneistoff liegen die Nanopartikel in anisometrischer, plättchenartiger Form vor. Bei den estradiol- und hydrocortisonhaltigen Systemen, d.h. denen mit schwer löslichen Arzneistoffen, können keine Kristallite der

Arzneistoffe bei den verwendeten Konzentrationen gefunden werden. Daher kann bei diesen Arzneistoffen von einer effektiven Verkapselung in den Nanopartikeln ausgegangen werden.

4.5.2.3 Bestimmung der Beladungskapazität

Zur Beurteilung der Beladungskapazität der Nanopartikel, d.h. der Verkapselungsrate bei den verwendeten Arzneistoffkonzentrationen, werden zunächst Zentrifugationsversuche durchgeführt.

Die Zentrifugation erfolgt bei sehr hohen Beschleunigungen von bis zu 600000xG in einer Ultrazentrifuge, ist aber zur quantitativen Abtrennung der Partikel nicht geeignet, sodass die direkte Arzneistoffbestimmung in den Partikeln nicht möglich ist. Beobachtet werden kann lediglich eine Schlierenbildung im oberen Bereich der Zentrifugenröhrchen. Dieser Befund unterstreicht, dass die entwickelten Nanosuspensionen eine vernachlässigbare Neigung zur Aufräumung besitzen.

Zur indirekten Bestimmung der Beladungskapazität werden nach Separation der Außenphase mittels Zwangsfiltration die Arzneistoffgehalte im wässrigen Medium bestimmt und durch Differenzbildung auf den Gehalt in den Partikeln rückgeschlossen (vgl. Abschnitt 3.2.19). Die Ergebnisse der Gehaltsbestimmung sowie die berechneten Beladungskapazitäten sind in Tabelle 4.21 wiedergegeben.

Tabelle 4.21: Beladungskapazität der Nanopartikel.

Arzneistoff (AS)	AS gesamt [% (m/m)] (1)	System	n	AS in Außenphase [% von (1)] (2)	AS in SLN [% von (1)] 100-(2)
Pilocarpin-Base	1,0	SRMS100	4	63,35 ± 1,20	36,65 ± 1,20
		SRMS142	4	59,68 ± 1,41	40,32 ± 1,41
Estradiol	0,1	SRMS100	7	1,00 ± 0,37	99,00 ± 0,37
		SRMS142	7	0,75 ± 0,38	99,25 ± 0,38
Hydrocortison	0,5	SRMS100	5	3,30 ± 1,42	96,70 ± 1,42
		SRMS142	3	3,52 ± 0,31	96,48 ± 0,31

Pilocarpin-Base, die lipophiler als das Hydrochlorid, aber immer noch ein hydrophiler Arzneistoff ist, wird bei einer verwendeten Arzneistoffkonzentration von 1,0 % (m/m) zu 37 % (SRMS100) bzw. 40 % (SRMS142) in den Nanopartikeln verkapselt. Es befinden sich aufgrund der Arzneistoffdiffusion ins wässrige Außenmedium während des Homogenisierungsprozesses, bei dem die Partikel angeschmolzen sind, nahezu zwei Drittel in der Außenphase.

Im Gegensatz zur hydrophilen Pilocarpin-Base ist die Beladungskapazität für die, allgemein schwer löslichen und eher lipophilen, Arzneistoffe Estradiol und Hydrocortison sehr hoch. Mit 99 % (Estradiol) bzw. 97 % (Hydrocortison) befindet sich fast der gesamte eingesetzte Arzneistoff innerhalb der Partikel. Die, in der wässrigen Außenphase analysierten, Arzneistoffkonzentrationen liegen dabei im Bereich der Sättigungskonzentration der Arzneistoffe in Wasser [Peters 2000]. Gefunden werden ca. 12 µg/ml Estradiol und 200 µg/ml Hydrocortison.

Die SRMS basierten Nanosuspensionen scheinen für die schwer löslichen Arzneistoffe Estradiol und Hydrocortison ein geeignetes wässriges Trägersystem darzustellen, für hydrophile Substanzen ist es dagegen nur bedingt verwendbar. Dabei muss erwähnt werden, dass Systeme mit reduzierter Pilocarpinkonzentration in den Nanosuspensionen (unter 1 % (m/m)) nicht untersucht werden.

4.5.3 Permeationsuntersuchungen

Vergleichende Permeationsuntersuchungen werden durchgeführt, um abzuschätzen, mit welcher Geschwindigkeit und in welcher Menge die Arzneistoffe durch ein humanes, organotypisches Cornea-Konstrukt als in vitro Modell des Applikationsortes nach vorheriger Freisetzung aus den Partikeln bzw. Nanosuspensionen permeieren.

4.5.3.1 Pilocarpin

Die Permeation aus den pilocarpinhaltigen Systemen wird mit der Permeation aus einer 0,77 %igen (m/m), auf pH 6,8 gepufferten, wässrigen Lösung des Arzneistoffs verglichen. Diese Konzentration ist ebenfalls in der Außenphase der Nanosuspensionen nach der Hochdruckhomogenisation zu detektieren. Abbildung 4.38 stellt die Permeations-Zeit-Profile der pilocarpinhaltigen Systeme dar. Der Flux J, der im linearen Bereich der Graphen aus der Steigung ermittelt wird, ist Tabelle 4.22 zu entnehmen.

men, genauso wie der Permeationskoeffizient P , der sich aus dem Flux durch Division durch die Ausgangskonzentration c_0 (m/V) entsprechend Gleichung 4.15 berechnet.

$$P = \frac{J}{c_0} \quad (\text{Gl. 4.15})$$

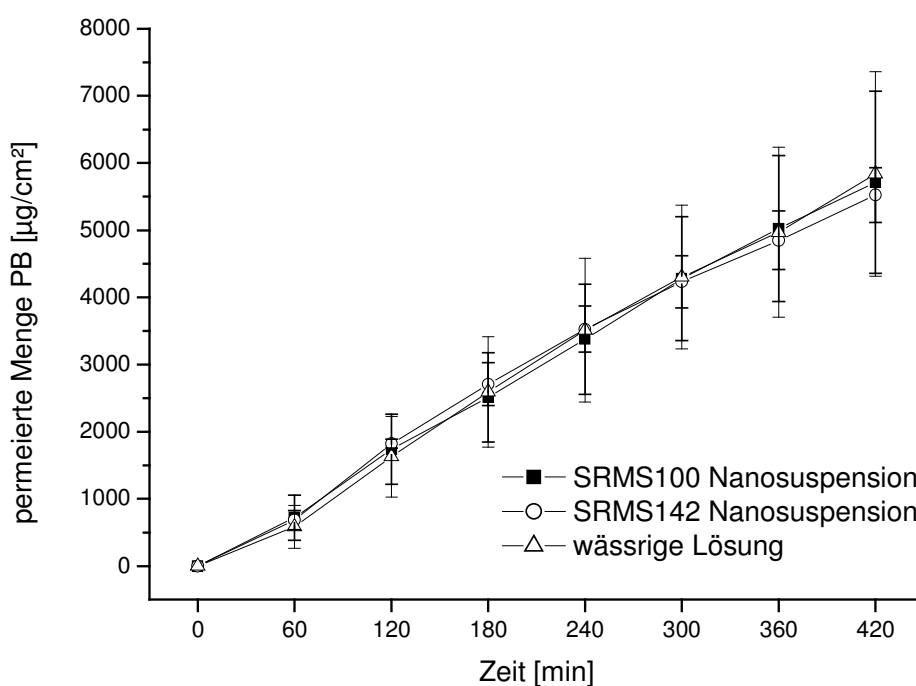


Abbildung 4.38: Permeation von PB aus den Nanosuspensionen mit 1,0 % (m/m) PB (n=6) und einer wässrigen Lösung mit 0,77 % (m/m) PB (n=5).

Tabelle 4.22: Arzneistoffflux und Permeationskoeffizient für die Permeation von PB aus den Nanosuspensionen mit 1,0 % (m/m) PB (n=6) und einer wässrigen Lösung mit 0,77 % (m/m) PB (n=5).

System	Flux J [10 ⁻⁸ g/(cm ² ·s)]	Permeationskoeffizient P [10 ⁻⁶ cm/s]
SRMS100 Nanosuspension	23,0 ± 5,0	22,6 ± 4,9
SRMS142 Nanosuspension	19,7 ± 1,2	19,5 ± 1,2
wässrige Lösung	23,9 ± 5,8	30,6 ± 7,4

Die drei untersuchten Systeme zeigen bezüglich des Flux ein identisches Permeationsverhalten. Auch die Permeationskoeffizienten zeigen keine signifikanten Unterschiede. Die Permeation wird lediglich durch die Pilocarpinkonzentration in der Außenphase bestimmt. Während der Versuchsdauer diffundieren keine zusätzlichen Arzneistoffmengen aus den Partikeln heraus. Die ermittelten Werte differieren leicht gegenüber einer Permeation aus Borocarpin S Augentropflösung, die 2 % (m/m) Pilocarpin-HCl enthält. Bei diesem Arzneimittel beträgt der Flux $27,0 \pm 6,1 \cdot 10^{-8} \text{ g}/(\text{cm}^2 \cdot \text{s})$ [Reichl 2003], während der konzentrationsbereinigte Permeationskoeffizient $13,4 \pm 3,0 \cdot 10^{-6} \text{ cm/s}$ groß ist [Reichl et al. 2004]. Dieser Unterschied zwischen den Permeationskoeffizienten hängt mit den differierenden pH-Werten der Systeme zusammen. Das Fertigarzneimittel besitzt einen pH von 5, während die Nanosuspensionen und die wässrige Lösung einen pH von 6,8 aufweisen. Entsprechend ist das Dissoziationsgleichgewicht bei den Nanosuspensionen zu Gunsten der lipophileren Base verschoben, die aufgrund ihres größeren Verteilungskoeffizienten leichter durch das Epithel der Cornea dringen kann. Als Folge sind die Permeationsrate und der Permeationskoeffizient erhöht.

4.5.3.2 Hydrocortison

Die Permeation von Hydrocortison aus den Nanosuspensionen wird mit der aus einer öligen Lösung von nur 0,02 % (m/m) Hydrocortison in Sesamöl verglichen, weil die Öllöslichkeit von Hydrocortison, ebenso wie die Löslichkeit in Wasser, sehr niedrig ist. Die nanopartikulären Systeme enthalten dagegen 0,5 % (m/m) des Glucocorticoids. Die Permeations-Zeit-Profile sind in Abbildung 4.39 dargestellt, während der kalkulierte Flux sowie der Permeationskoeffizient der Systeme Tabelle 4.23 zu entnehmen sind.

Die sehr niedrige Konzentration des Arzneistoffs in der öligen Lösung spiegelt sich in einem entsprechend niedrigen Flux wieder. Dieser ist ebenfalls auf die höhere Viskosität der öligen Lösung, im Vergleich zu den wässrigen Nanosuspensionen, zurückzuführen, wodurch der Diffusionskoeffizient im Vehikel erniedrigt wird. Dagegen ist die Permeationsrate aus den Nanosuspensionen erhöht und auch im Vergleich zu einer wässrigen Lösung kann bei den nanopartikulären Systemen ein, um den Faktor 10, höherer Arzneistoffflux beobachtet werden. Für diese wässrige Lösung mit 0,02 % (m/m) Hydrocortison wird ein Flux von $1,08 \pm 0,08 \cdot 10^{-9} \text{ g}/(\text{cm}^2 \cdot \text{s})$ [Reichl

2003] und ein Permeationskoeffizient von $5,41 \pm 0,40 \cdot 10^{-6}$ cm/s [Reichl et al. 2004] angegeben.

Ein entscheidender Faktor bei der Untersuchung der Permeation ist die Konzentration des Arzneistoffs in der, der Cornea zugänglichen, Außenphase der Formulierung. Die Hydrocortisonkonzentration in der Außenphase der Nanosuspensionen (etwa 200 µg/ml) entspricht bei einer Temperatur von 20 °C ungefähr den Arzneistoffkonzentrationen in der öligen und wässrigen Lösung (0,02 % (m/m)). Daher müssten eigentlich vergleichbare Permeationskurven für die Lösungen und die Nanosuspensionen resultieren. Durch das Aufschmelzen der Partikel während des Versuchs könnte es zu einem geringfügigen Austritt von Lecithin aus den Partikeln kommen, das mit dem Emulgator Polysorbat 80 Mischmizellen bilden kann. Der Arzneistoff könnte in diesen Assoziaten solubilisiert werden und so die Konzentration an Hydrocortison in der wässrigen Phase erhöhen. Auch die Messtemperatur von 37 °C beeinflusst die Löslichkeit des Hydrocortison. Da im Falle der Nanosuspensionen der Arzneistoff aus den Partikeln nachdiffundieren kann, könnte die gelöste Konzentration in der Außenphase erhöht sein, während die Konzentration der Lösungen konstant bleibt.

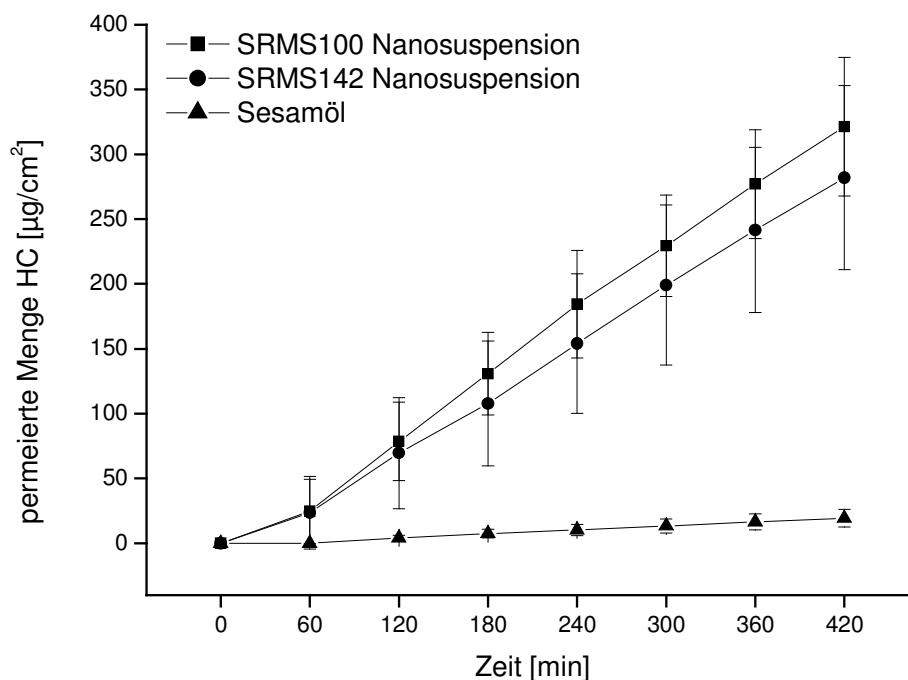


Abbildung 4.39: Permeation von HC aus den Nanosuspensionen mit 0,5 % (m/m) HC (SRMS100: n=8, SRMS142: n=7) und einer Lösung von 0,02 % (m/m) HC in Sesamöl (n=8).

Tabelle 4.23: Arzneistoffflux und Permeationskoeffizient für die Permeation von HC aus den Nanosuspensionen mit 0,5 % (m/m) HC (SRMS100: n=8, SRMS142: n=7) und einer Lösung von 0,02 % (m/m) HC in Sesamöl (n=9).

System	Flux J [10⁻⁹ g/(cm²·s)]	Permeationskoeffizient P [10⁻⁶ cm/s]
SRMS100 Nanosuspension	13,64 ± 2,41	2,69 ± 0,47
SRMS142 Nanosuspension	11,98 ± 2,88	2,34 ± 0,57
Sesamöl	0,87 ± 0,28	4,41 ± 1,44

Betrachtet man die Permeationskoeffizienten, so zeigt sich ein niedrigerer Wert bei den Nanosuspensionen, wenn die Gesamtkonzentration der Systeme berücksichtigt wird. Die Koeffizienten sind etwa um den Faktor 2 erniedrigt gegenüber der öligen Lösung und der wässrigen Lösung mit einer Hydrocortisonkonzentration von 0,02 % (m/m). Bewertet man insgesamt die Ergebnisse, so permeiert der Arzneistoff aus den Nanosuspensionen nicht verzögert oder verlangsamt durch das Cornea-Konstrukt. Da aber der größte Anteil in den Partikeln oder Tröpfchen lokalisiert ist und das Hydrocortison entsprechend immer nachgeliefert werden kann, sind die Systeme geeignet, den Arzneistoff über einen verlängerten Zeitraum freizugeben, was für ein Drug Delivery System, neben einer verzögerten Freisetzung, ebenfalls ein wichtiges Kriterium ist.

Im Vergleich zu dem SRMS100-haltigen System sind der Flux und der Permeationskoeffizient bei der Nanosuspension auf Basis von SRMS142 erniedrigt. Diese tendenzielle, aber nicht signifikante Verringerung kann mit einer höheren Viskosität der dispersen SRMS142-Phase der Nanosuspension erklärt werden. Bei einer Temperatur von 37 °C sind die Partikel beider Systeme geschmolzen (vgl. Abschnitt 4.4.3.1). Aufgrund der längeren Fettsäureketten des S142 ist die Viskosität dieses Hartfetts im geschmolzenen Zustand jedoch erhöht (vgl. Abschnitt 4.2.1.7), was zu einem niedrigeren Diffusionskoeffizienten des Hydrocortisons in der Innenphase führt, da die Viskosität nach dem Stokes-Einstein'schen Gesetz in den Nenner des Diffusionskoeffizienten D eingeht (Gleichung 4.16).

$$D = \frac{k \cdot T}{6 \cdot \pi \cdot r \cdot \eta} \quad (\text{Gl. 4.16})$$

4.5.3.3 Estradiol

Verglichen mit Hydrocortison permeiert Estradiol so langsam und in geringer Menge, dass die Nachweisgrenze der verwendeten HPLC-Analytik unterschritten wird. Daher werden diese Konzentrationen per ELISA bestimmt und lediglich eine vergleichende Untersuchung der beiden Nanosuspensionen durchgeführt (Abbildung 4.40). Der Flux und der Permeationskoeffizient sind in Tabelle 4.24 aufgeführt.

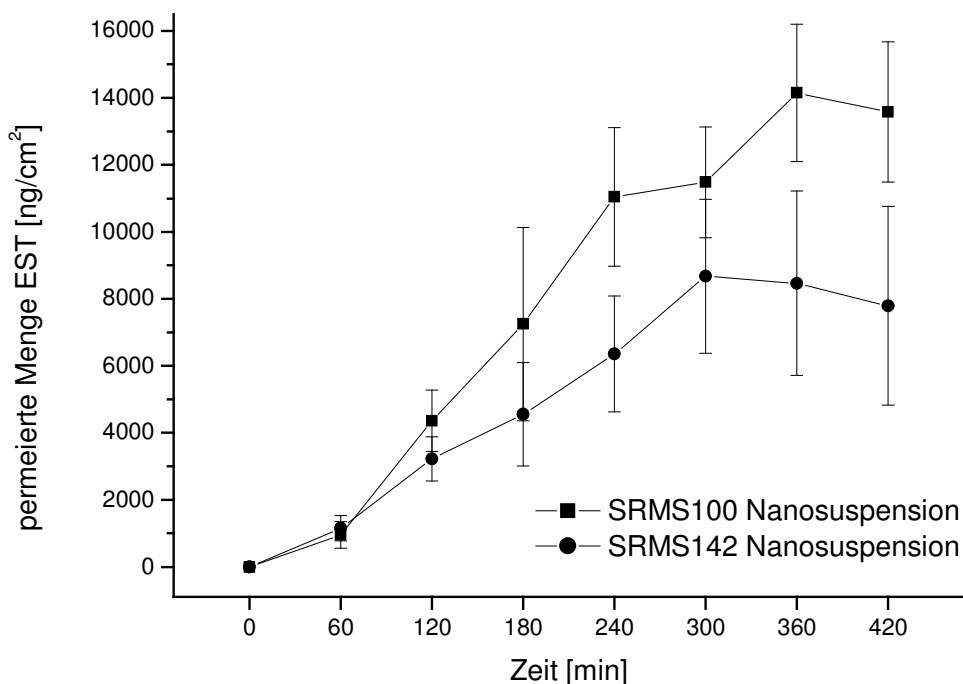


Abbildung 4.40: Permeation von EST aus den Nanosuspensionen mit 0,1 % (m/m) EST (n=4).

Tabelle 4.24: Arzneistoffflux und Permeationskoeffizient für die Permeation von EST aus den Nanosuspensionen mit 0,1 % (m/m) EST (n=4).

System	Flux J [10^{-10} g/(cm ² ·s)]	Permeationskoeffizient P [10^{-7} cm/s]
SRMS100 Nanosuspension	7,50 ± 1,98	7,31 ± 1,93
SRMS142 Nanosuspension	4,89 ± 1,61	4,76 ± 1,57

In Bezug auf Hydrocortison ist der Flux etwa um den Faktor 10, der Permeationskoeffizient etwa um den Faktor 4 erniedrigt. Wiederum kann eine tendenzielle Verringerung von Flux und Permeationskoeffizient bei der SRMS142-haltigen Nanosuspension, im Vergleich zum System mit SRMS100, beobachtet werden. Auch dieser Befund liegt in der höheren Viskosität SRMS142-haltiger, geschmolzener Partikel begründet, die den Diffusionskoeffizienten des, nahezu vollständig in den Partikeln inkorporierten, Arzneistoffs erniedrigt.

4.5.4 Freisetzungsuntersuchungen estradiolhaltiger Systeme

Als Alternative zu Permeationsuntersuchungen estradiolhaltiger Systeme werden mit dem Estrogen Freisetzungsuntersuchungen durchgeführt, bei denen die Arzneistoffgehalte im Akzeptormedium per HPLC-Analytik detektierbar sind.

In Abbildung 4.41 sind die freigesetzten Estradiolmengen über der Wurzel der Zeit für die Nanosuspensionen und für ölige Lösungen bei einer Versuchstemperatur von 37 °C dargestellt.

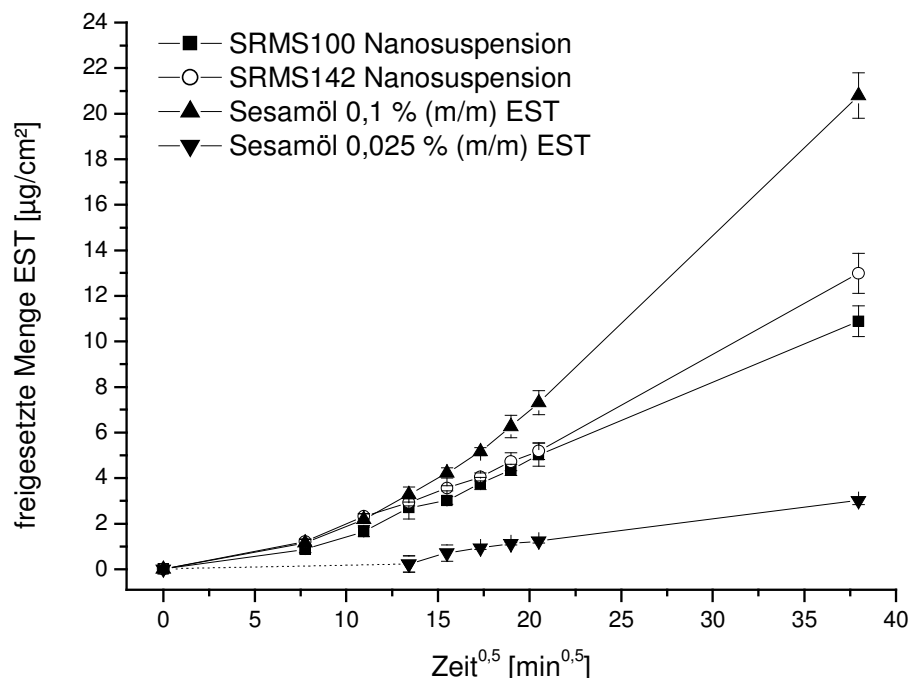


Abbildung 4.41: Freisetzung von EST aus den Nanosuspensionen mit 0,1 % (m/m) EST und Lösungen von 0,025 % (m/m) und 0,1 % (m/m) EST in Sesamöl (n=6) bei 37 °C.

Bei der Freisetzung des Estradiols aus den Systemen liegt eine Mischkinetik vor. Weder in der linearen Auftragung (nicht dargestellt), noch in dem, in Abbildung 4.41 dargestellten, Higuchi-Plot kann eine Linearität über die gesamte Versuchsdauer beobachtet werden. Da jedoch im terminalen Bereich der Freisetzungsprofile annähernde Linearität erreicht wird, wird für die Kalkulation von Flux und Diffusionskoeffizient auf diese Darstellung zurückgegriffen. Der Flux J wird, wie bei den Permeationsuntersuchungen, aus der Steigung im linearen Abschnitt der Profile ermittelt, während der scheinbare Diffusionskoeffizient D_s im Falle einer Lösung nach

$$Q = 2 \cdot A \cdot c_0 \cdot \sqrt{\frac{D_s \cdot t}{\pi}} \quad (\text{Gl. 4.17})$$

und bei Vorliegen einer Suspension mit Hilfe der Gleichung

$$Q = A \cdot \sqrt{2 \cdot D_s \cdot c_0 \cdot c_s \cdot t} \quad (\text{Gl. 4.18})$$

berechnet wird. Dabei ist c_0 die Gesamtkonzentration des Arzneistoffs im Donator, c_s die Sättigungskonzentration im Donator, Q die freigesetzte Menge Estradiol und Q/A über der Wurzel der Zeit entsprechend der Flux. Diese Gleichungen, die für halbfeste Systeme entwickelt wurden, gehen auf Higuchi (1967) zurück und berücksichtigen vor allem die, in der Außenphase gelöste, Arzneistoffkonzentration, d.h. den direkt der Freisetzungsfläche zugänglichen Arzneistoff. Da im Falle der Nanosuspensionen der Arzneistoff in den Partikeln gelöst vorliegt, wird als dritter Freisetzungsparameter ein normierter Flux J/c_0 eingeführt, der in jedem Fall die Gesamtarzneistoffkonzentration des jeweiligen Systems berücksichtigt und die Sättigungskonzentration vernachlässigt. Die Freisetzungsparameter Flux J , Diffusionskoeffizient D und normierter Flux J/c_0 sind in Tabelle 4.25 aufgeführt.

Im Vergleich zu einer öligen Lösung gleicher Konzentration wird das Estradiol aus den Nanosuspensionen verlangsamt freigesetzt, was sich im Flux und im normierten Flux widerspiegelt. Auch in Bezug auf eine Lösung von 0,025 % (m/m) Estradiol in Sesamöl, wie sie auch in der Therapie der menopausalen Keratokonjunktivitis sicca eingesetzt wird [Sator et al. 1998], ist der normierte Flux leicht erniedrigt. Aufgrund der höheren Ausgangskonzentration des Arzneistoffs ist jedoch insgesamt eine Freisetzung in größerem Ausmaß gegeben.

Im Falle der beiden öligen Lösungen müssten theoretisch die gleichen Diffusionskoeffizienten kalkuliert werden. Chen-Chow und Frank (1981) beschreiben, dass die Diffusionsgeschwindigkeit von der gelösten Konzentration abhängig ist. Da in beiden Fällen eine Lösung vorliegt, ist der deutlich erniedrigte Diffusionskoeffizient für das niedriger konzentrierte System nicht zu erwarten, da D eine konzentrationsbereinigte Geschwindigkeit darstellt. Es scheint also ein überproportionaler Anstieg der Diffusionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der Konzentration des Arzneistoffs vorzuliegen und kein linearer Zusammenhang.

Tabelle 4.25: Arzneistoffflux J , Diffusionskoeffizient D und normierter Flux J/c_0 für die Freisetzung von EST aus verschiedenen Systemen (Nanosuspensionen und ölige Lösungen: $n=6$, wässrige Suspension: $n=3$).

System	EST [% (m/m)]	J [$10^{-8} \text{ g}/(\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{0,5})$]	D [$10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$]	J/c_0 [$10^{-5} \text{ cm}/\text{s}^{0,5}$]
SRMS100 SLN, 37 °C	0,1	4,42 $\pm 0,34$	6,40 $\pm 0,97$	4,27 $\pm 0,33$
SRMS142 SLN, 37 °C	0,1	3,98 $\pm 0,37$	6,38 $\pm 1,22$	3,95 $\pm 0,37$
SRMS100 SLN, 20 °C	0,1	2,47 $\pm 0,29$	2,02 $\pm 0,46$	2,40 $\pm 0,28$
SRMS142 SLN, 20 °C	0,1	2,85 $\pm 0,11$	3,19 $\pm 0,24$	2,77 $\pm 0,10$
0,1 % (m/m) EST in Sesamöl, 37 °C	0,1	9,42 $\pm 0,66$	0,82 $\pm 0,12$	10,20 $\pm 0,72$
0,025 % (m/m) EST in Sesamöl, 37 °C	0,025	1,27 $\pm 0,09$	0,24 $\pm 0,03$	5,54 $\pm 0,38$
wässrige Suspension, 37 °C	0,122	4,70 $\pm 0,11$	59,9 $\pm 2,78$	3,85 $\pm 0,09$

Werden die beiden Nanosuspensionen miteinander verglichen, so kann bezüglich aller drei Freisetzungsparemeter, wie schon bei den Permeationsversuchen, eine Verringerung beim SRMS142-haltigen System beobachtet werden. Diese Tendenz ist wieder auf die höhere Viskosität von SRMS142-Tröpfchen zurückzuführen.

Einen Vergleich der Freisetzung von Estradiol aus geschmolzenen Partikeln (37 °C) und festen Partikeln (20 °C) zeigt Abbildung 4.42, die Freisetzungsdaten sind wiederum Tabelle 4.25 zu entnehmen. Wie zu erwarten, ist die Geschwindigkeit der

Arzneistofffreisetzung bei einer Temperatur von 20 °C, d.h. bei Vorhandensein fester Partikel, signifikant reduziert gegenüber den geschmolzenen Partikeln bei 37 °C. Da sich der Arzneistoff nahezu vollständig in den Partikeln aufhält und diese durch den festen Zustand eine, im Vergleich zur Schmelze, hohe Viskosität aufweisen, sind der Diffusionskoeffizient und der normierte Flux auf etwa die Hälfte herabgesetzt. Dabei zeigen die SRMS142-haltigen Nanosuspensionen im festen Zustand keine verringerte Diffusionsgeschwindigkeit in Bezug zum System mit SRMS100, da im festen Zustand die Viskosität der Partikel der beiden Systeme annähernd gleich sein wird bzw. die freie Beweglichkeit des Estradiols nicht gegeben ist.

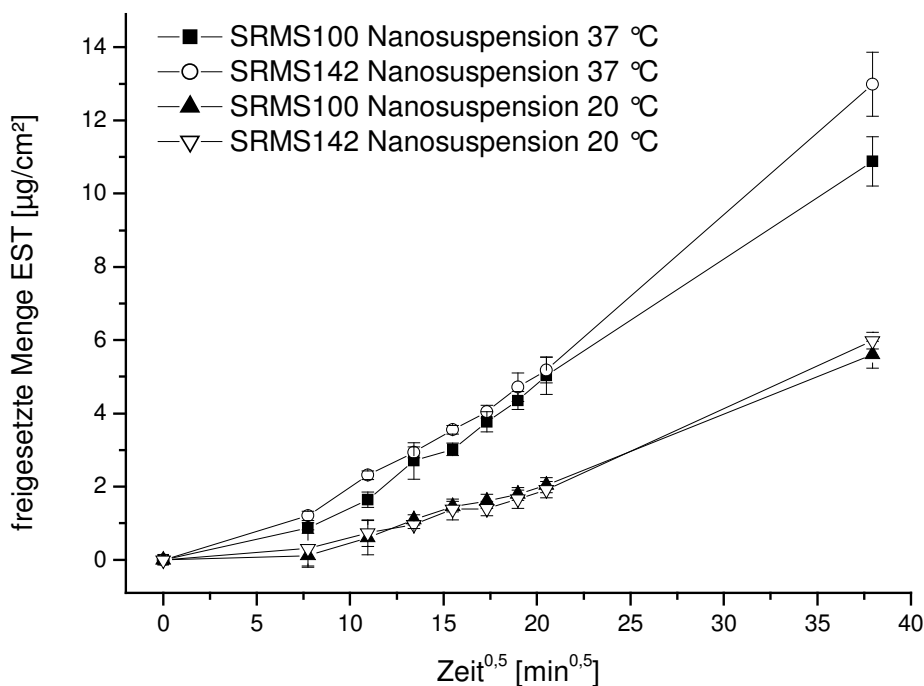


Abbildung 4.42: Freisetzung von EST aus den Nanosuspensionen mit 0,1 % (m/m) EST bei 20 °C und 37 °C (n=6).

In Abbildung 4.43 ist die Estradiolfreisetzung aus den Nanosuspensionen im Vergleich zu einer wässrigen Suspension einer ähnlichen Arzneistoffkonzentration dargestellt, die Daten sind ebenfalls in Tabelle 4.25 aufgeführt.

Die Liberation des Estradiols aus einer wässrigen Suspension, die eine Depotarzneiform darstellt, liegt auf einem ähnlichen Niveau wie die aus den Nanosuspensionen. Beim Diffusionskoeffizienten ist allerdings ein starker Anstieg zu beobachten, der in der niedrigeren Konzentration des Arzneistoffs in der wässrigen Phase der reinen Suspension begründet liegt. Die Konzentration bei dieser Suspension liegt mit

1,5 µg/ml etwa um den Faktor 10 niedriger als die Sättigungskonzentration in der Außenphase der Nanosuspensionen (12-15 µg/ml), was mit dem Fehlen von Solubilisatoren erklärt werden kann. Die Freigabe aus den Nanopartikeln scheint langsamer als die Auflösung der Makrokristalle der Estradiolsuspension zu erfolgen, obwohl diese, in Relation zu den Nanopartikeln, eine sehr viel geringere Oberfläche besitzen. Die verlangsamte Freisetzung des Estradiols aus den Nanopartikeln ist, aufgrund der Tatsache, dass die Freisetzung trotz höherer Arzneistoffkonzentration in der Außenphase in gleichem Ausmaß wie die aus der reinen Estradiolsuspension stattfindet, umso höher zu bewerten.

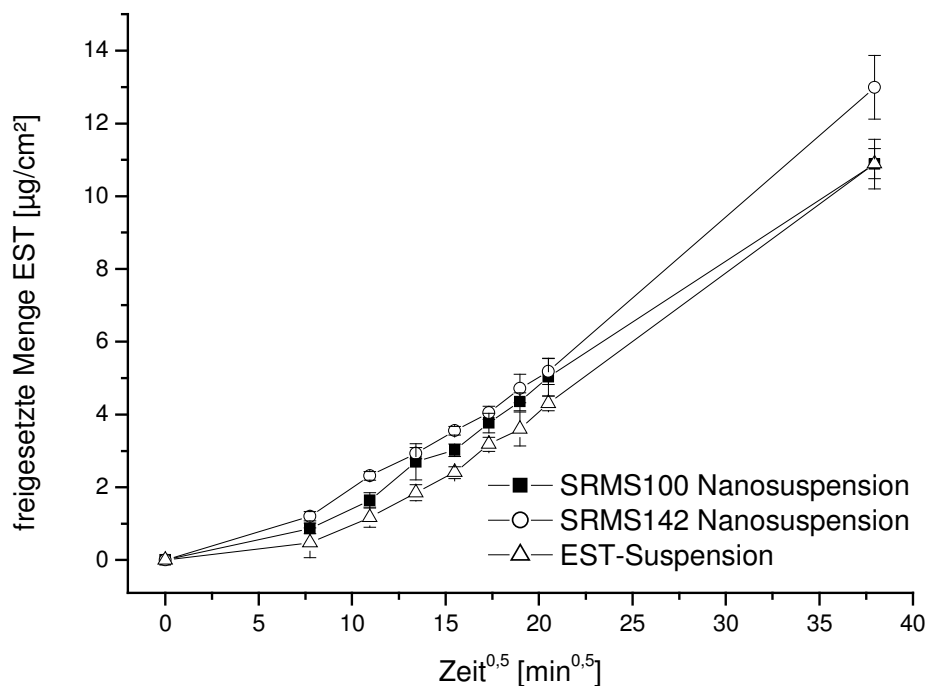


Abbildung 4.43: Freisetzung von EST aus den Nanosuspensionen mit 0,1 % (m/m) EST (n=6) und einer wässrigen Suspension mit 0,122 % (m/m) EST (n=3) bei 37 °C.

4.5.5 Zusammenfassende Diskussion der Ergebnisse der Arzneistoffbeladung und Charakterisierung arzneistoffhaltiger SRMS basierter Nanosuspensionen

Zur Herstellung arzneistoffbeladener, SRMS basierter Nanosuspensionen ist, in Abhängigkeit vom jeweiligen Arzneistoff, eine Rezepturanpassung bzw. -optimierung notwendig.

Pilocarpin-Base diffundiert während des Herstellungsprozesses in einem Ausmaß in die wässrige Phase, dass hypertone Systeme mit, ins Basische verschobenen, pH-Werten resultieren. Dies liegt in der Hydrophilie des Arzneistoffs begründet. Eine Reduktion des Sorbitolanteils und die Verwendung eines Phosphatpuffers verbessert das System, das aber weiterhin suboptimal ist.

Die Verwendung eines hohen Estradiolanteils in der Lipidmatrix führt, aufgrund der quasi vollständigen Wasserunlöslichkeit des Arzneistoffs, zur Ausfällung mit entsprechender Sedimentbildung. Die Rekristallisation der Hartfette in der höher geordneten β -Modifikation kann als weiterer Grund für den Austritt des Arzneistoffs aus den Partikeln angesehen werden. Die Reduzierung der Gesamtkonzentration auf 0,1 % (m/m) Estradiol führt zu akzeptablen, isotonen Nanosuspensionen.

Die Hochdruckhomogenisation hydrocortisonhaltiger Suspensionen, bei denen von vornherein nicht eine Konzentration nahe der Solubilisationsgrenze, sondern ein Gesamtgehalt von 0,5 % (m/m) verwendet wird, bringt ebenfalls zufriedenstellende Nanosuspensionen hervor.

Die entwickelten Systeme zeigen makroskopisch keine Auffälligkeiten, im Vergleich zu den arzneistofffreien Suspensionen, und besitzen mittlere Partikelgrößen von bis zu 140 nm mit Polydispersitätsindices unter 0,3. Dabei wird das Zetapotential der Nanopartikel von keinem der drei untersuchten Arzneistoffe beeinflusst und ist somit im neutralen Bereich lokalisiert. Auch elektronenmikroskopisch lässt sich keine Veränderung der partikulären Strukturen durch die Arzneistoffe feststellen. Die Partikel zeigen weiterhin eine anisometrische, plättchenartige Form und auskristallisierter Arzneistoff des schwerlöslichen Estradiols bzw. Hydrocortisons kann nicht identifiziert werden.

Die Beladungskapazität der Nanosuspensionen für Pilocarpin-Base ist, wie durch die beobachtete Hypertonisierung bereits erwartet, niedrig. Lediglich 35-40 % der eingesetzten Arzneistoffmenge von 1 % (m/m) befinden sich in den Partikeln, da die Diffusion ins wässrige Dispersionsmedium während des Homogenisierungsprozesses in ho-

hem Maße stattfindet. Die, in Wasser schwer löslichen, Arzneistoffe Estradiol und Hydrocortison werden dagegen nahezu vollständig in den Nanopartikeln verkapselt. Die Beladungskapazität für Estradiol beträgt bei einer Konzentration von 0,1 % (m/m) etwa 99 %, Hydrocortison wird bei eingesetzten 0,5 % (m/m) zu 97 % verkapselt. Die, in der Außenphase gefundenen, Gehalte dieser beiden Arzneistoffe liegen im Bereich der Sättigungskonzentration in Wasser. Bezüglich der Verkapselungsrate sind die Nanosuspensionen für Pilocarpin-Base bei einer Konzentration von 1 % (m/m) nur bedingt als kolloidales Trägersystem geeignet, für schwer lösliche Arzneistoffe wie Estradiol und Hydrocortison stellen sie einen effektiven Drug Carrier dar.

Untersuchungen der Permeation der Arzneistoffe durch ein humanes, organotypisches Cornea-Konstrukt zeigen, dass die Pilocarpinkonzentration in der wässrigen Phase zu hoch ist, um Unterschiede, im Vergleich zu einer wässrigen Arzneistofflösung, zu detektieren. Hingegen permeiert Hydrocortison aus den Nanosuspensionen trotz einer ähnlichen Konzentration in der Außenphase in höherem Ausmaß durch das Cornea-Konstrukt als aus einer öligen oder wässrigen Lösung mit einer geringeren Gesamtkonzentration, die konzentrationsbereinigten Permeationskoeffizienten sind allerdings erniedrigt. Hydrocortison permeiert aus den Nanosuspensionen nicht verzögert oder verlangsamt durch das Cornea-Konstrukt. Da die Nanosuspensionen die Möglichkeit bieten, den Arzneistoff aus den Partikeln nachdiffundieren zu lassen, ist jedoch eine Freisetzung des Glucocorticoids über einen längeren Zeitraum zu erwarten. Die Permeationsrate von Hydrocortison ist bei den SRMS142-haltigen Systemen tendenziell niedriger als die der Systeme mit SRMS100. Dieser Befund liegt in der höheren Viskosität von SRMS142-Tröpfchen in der Schmelze begründet. Einhergehend wird der Diffusionskoeffizient des Arzneistoffs in der Lipidphase erniedrigt. Dieser Effekt ist auch bei Permeations- und Freisetzungsuntersuchungen des Estradiols zu beobachten, wobei die Permeation des Arzneistoffs so langsam und in geringer Menge erfolgt, dass ein ELISA zur Bestimmung permeierter Estradiolmengen verwendet werden muss. Die Permeationskoeffizienten sind um den Faktor 4, in Relation zu hydrocortisonhaltigen Systemen, erniedrigt.

Der Vergleich der Liberation von Estradiol aus verschiedenen Systemen zeigt, dass das Estrogen aus den Nanosuspensionen verzögert freigesetzt wird. Die Freisetzungsrates, in Bezug zu einer öligen Lösung gleicher Konzentration, ist erniedrigt. Auch bei Einsatz einer niedriger konzentrierten Lösung des Arzneistoffs in Sesamöl

wird konzentrationsbereinigt ein höherer normierter Flux erzielt. Befinden sich die Partikel bei Raumtemperatur im festen Zustand, so ist die Freisetzung von Estradiol verlangsamt und reduziert, da der, nahezu vollständig in den Partikeln lokalisierte, Arzneistoff in seiner Mobilität eingeschränkt ist. Durch die Auswahl des verwendeten Hartfetts hinsichtlich seines Schmelzpunkts ist entsprechend eine Steuerung der Arzneistofffreisetzung möglich. Die beiden verwendeten Lipidmatrices sind bei der Messtemperatur von 37 °C geschmolzen, wird aber ein höher schmelzendes Lipid verwendet, ist eine weitere Verzögerung der Liberation erzielbar. Ein, bei 37 °C beobachteter, tendenzieller Unterschied zwischen den beiden Nanosuspensionen kann bei Raumtemperatur nicht festgestellt werden. Im Vergleich zu einer wässrigen Estradiolsuspension liegt das Ausmaß der Freisetzung aus den Nanopartikeln trotz höherer Konzentration in der Außenphase auf gleichem Niveau. Die Diffusion des Estradiols aus den Partikeln scheint langsamer als die Auflösung der Estradiolkristalle zu erfolgen.

5 Abschlussdiskussion

5.1 Charakterisierung von Lecithin-Hartfett-Mischungen

5.1.1 Einfluss von Lecithin auf physikochemische Eigenschaften von Hartfetten

Nach Zusatz des Lecithins P90G, das in den Hartfetten mit dem Ziel inkorporiert wird, die Solubilisationsfähigkeit der Lipide für Arzneistoffe zu erhöhen, bleiben die Eigenschaften der Hartfette S100 und S142 im Wesentlichen erhalten.

So werden die Schmelzpeakminima der Hartfette von 35,5 °C (S100) bzw. 44,1 °C (S142) durch den Phospholipidzusatz nicht verändert, wobei ein breiter Peak mit einer einleitenden Schulter bei den Hartfetten pflanzlichen Ursprungs auf die breite Fettsäureverteilung der Triglyceride zurückzuführen ist. Im Gegensatz zu Untersuchungen von Schneeweis (1999) kann bezüglich der Lage des Schmelzübergangs der Hartfette keine Verschiebung zu niedrigeren Temperaturen, z.B. durch die Störung polarer Bindungen, festgestellt werden. Die Übergänge werden jedoch durch den erhöhten Anteil nicht-kristallinen Materials breiter und die Schmelzenthalpien verringern sich linear mit steigendem Lecithingehalt. Eingearbeitetes Lecithin führt insofern zu einer Störung der Kristallisation der Hartfette als ein überproportionales Absinken der Schmelzenthalpie beobachtet wird. Rechnerisch ergibt sich bei einer Hartfettmenge von 9,9 % (m/m) S100 bzw. 11,2 % (m/m) S142 eine Enthalpie von null, was bedeutet, dass die Kristallisation der Hartfette in entsprechendem Ausmaß durch Lecithin gestört wird.

Die Kristallmodifikation der Hartfette als weiterer wichtiger Parameter von Triglyceriden wird zunächst bis zu einer Lecithinkonzentration von 50 % (m/m) nicht beeinflusst. Die Lipide kristallisieren in einer metastabilen, orthorhombischen β' -Modifikation, die sich in typischen, von Larsson (1966) und Hagemann (1988) beschriebenen, Netzebenenabständen von 0,38 und 0,42 nm widerspiegelt. Bei einem Gehalt von 60 % (m/m) Lecithin ist zusätzlich zu den Hauptinterferenzen der Triglyceride eine Interferenz mit einem Netzebenenabstand von etwa 1,5 nm zu beobachten, die dem Phospholipid zuzuordnen ist. Ab dieser Konzentration ist Lecithin also in größeren Verbänden kristalliner oder flüssigkristalliner Art nachweisbar, bis zu einem Lecithingehalt von 50 % (m/m) findet eine Inkorporation in kolloidal gelöster Form statt. Eine weitere Interferenz im Bereich der Fernordnung bei 1,21-1,34 nm, die so-

wohl bei Lecithin als auch bei beiden Hartfetten zu identifizieren ist, nimmt in ihrer Intensität mit zunehmendem Lecithinanteil, im Gegensatz zu den beiden Hauptinterferenzen des jeweiligen Hartfetts, ebenfalls zu. Dies erlaubt den Rückschluss, dass neben kolloidal gelöstem Amphiphil bereits bei Konzentrationen bis 50 % (m/m) größere geordnete Lecithinassoziate vorliegen.

Ein stabilisierender Effekt des Lecithins auf die Hartfette ist zeitabhängig mittels Röntgenbeugung zu beobachten. Erste Anzeichen des Auftretens einer stabilen, triklinen β -Form, die durch Gitterabstände von 0,37, 0,39 und 0,46 nm identifiziert wird [Larsson 1966, Hagemann 1988], können bei den lecithinhaltigen Proben nach 127 Tagen Lagerung, bei den reinen Hartfetten jedoch erst nach 253 Tagen beobachtet werden. Die Bildung eines anderen Kristallhabitus bzw. die Kristallisation in größeren Kristallen durch den Einfluss von Phospholipiden ist in der Literatur beschrieben [Smith 2000], ebenso die stabilisierenden Eigenschaften von geringen Lecithinzusätzen [Thoma und Serno 1983].

Eine Kristallisation größerer Kristalle in den Lecithin-Hartfett-Mischungen kann auch mit Hilfe der Polarisationsmikroskopie festgestellt werden. Zusätzlich können in schnell erstarrten, lecithinhaltigen Proben Texturen identifiziert werden, die auf das Vorliegen einer hexagonalen Mesophase hindeuten. Nach Rosevear (1954) und Saupe (1977) erscheinen Hexagonalphasen vorwiegend als flächige, unscharfe Farbeindrücke. Eine Assoziation lang gestreckter Stäbchenmizellen, d.h. die Bildung einer hexagonalen Mesophase, unterstreicht das, entsprechend den Ergebnissen der Röntgenweitwinkeluntersuchungen postulierte, Vorliegen größerer Lecithinverbände im Hartfett. Die Hexagonalphase kann als Übergangsstruktur zwischen inversen Mizellen und einem lamellaren Flüssigkristall interpretiert werden, wie es bereits von Mackeben et al. (2001) für wasserhaltige Systeme beschrieben ist.

Polarisationsmikroskopische Untersuchungen von Kontaktpräparaten der Lipide an der Phasengrenze zu Wasser zeigen, dass es nur bei den Systemen mit Lecithin nach dem Schmelzen der Lipidphase zur Bildung einer lamellaren Mesophase an der Phasengrenze zum Wasser kommt. In erstarrtem Zustand der Lipide bleibt die Grenzfläche jedoch indifferent, da das Lecithin im Hartfett immobilisiert vorliegt.

5.1.2 Nachweis inverser Mizellen

Mit Hilfe der Transmissionselektronenmikroskopie können neben den, für das Kristallgitter der Triglyceride typischen, planaren, terrassenförmig geschichteten Flächen andersartig strukturierte Bereiche in 1:1 (m/m) Mischungen aus Lecithin und Hartfett gefunden werden. In diesen Bereichen sind sphärische Assoziate von 10-20 nm Durchmesser festzustellen, die auf inverse Mizellen hinweisen, die demnach sogar in den erstarrten Mischungen erhalten bleiben. Da die globulär strukturierten Bereiche keine der Lecithinmenge entsprechende, sondern eine geringere Fläche einnehmen, ist unter Berücksichtigung der Ergebnisse der Röntgenuntersuchungen davon auszugehen, dass weiteres Phospholipid in größeren Verbänden assoziiert. Assoziate von etwa 11-12 nm können in den Schmelzen der 1:1 (m/m) Mischungen auch per PCS nachgewiesen werden, was ebenfalls für die Existenz inverser Mizellen spricht, deren Größenordnung in der Literatur mit 5-15 nm beschrieben ist [Papantoniou und Müller-Goymann 1995a, Schneeweis 1999, Friedrich et al. 2000, Mackeben und Müller-Goymann 2000].

Die erstarrten Lecithin-Hartfett-Mischungen können demnach als erstarrte invers mizellare Lösungen (SRMS) bezeichnet werden, in denen Lecithin sowohl in Form von inversen Mizellen als auch in größeren, flüssigkristallinen Verbänden vorliegt.

5.1.3 Solubilisation von Arzneistoffen in der SRMS

Die solubilisierbare Menge der untersuchten Arzneistoffe Pilocarpin-Base und -HCl, Estradiol und Hydrocortison in der Schmelze von P90G/S100-Mischungen ist sehr hoch und kann linear mit dem Lecithingehalt gesteigert werden. Von einer Interaktion mit dem Amphiphil, d.h. einer Lokalisation der Arzneistoffe in inversen Mizellen analog der Untersuchungen von Papantoniou (1995), Schneeweis (1999) und Friedrich et al. (2000), ist auszugehen. Pilocarpin-Base und -HCl sollten dabei aufgrund ihrer Polarität im Kern, Estradiol und Hydrocortison wegen ihres apolaren Gerüsts, das aber hydrophile Gruppen enthält, interkalierend zwischen den Lecithinmolekülen lokalisiert sein. Die Steigerung der solubilisierten Mengen durch Lecithin ist insbesondere bei den schlecht löslichen Arzneistoffen Estradiol und Hydrocortison hoch, wobei der solubilisierte Anteil der Arzneistoffe, mit Ausnahme des Pilocarpin-HCl, in P90G/S142-Mischungen etwas niedriger ist, als in den Systemen mit S100. Die mittlere Assoziatgröße dieses S142-Systems, das im geschmolzenen Zustand aufgrund

längerer Fettsäureketten, im Vergleich zu S100, eine höhere Viskosität aufweist, ist leicht erniedrigt und weniger Arzneistoff kann entsprechend in die Mizellen inkorporiert werden.

Durch thermoanalytische und röntgenographische Untersuchungen kann bewiesen werden, dass die, in der Schmelze von 1:1 (m/m) Mischungen aus Lecithin und Hartfett solubilisierbaren, Estradiolgehalte (S100: 10,0 % (m/m) S142: 8,5 % (m/m)) nach dem Erstarren der Mischungen keine Röntgeninterferenzen oder Schmelzübergänge erzeugen, sodass von molekulardispers gelöstem Arzneistoff auszugehen ist. Die mikroskopischen Untersuchungen pilocarpinhaltiger Systeme ergeben allerdings, dass bei Raumtemperatur mit 4,5 % (m/m) (S100) bzw. 4,2 % (m/m) (S142) geringere Konzentrationen an Pilocarpin-Base gelöst sind, als in der Schmelze bei 60 °C (S100: 7,0 % (m/m) PB, S142: 6,5 % (m/m) PB).

5.2 Entwicklung SRMS basierter Nanosuspensionen

Als Grundlage der zu entwickelnden Nanosuspensionen werden, aufgrund der Ergebnisse der Charakterisierung der Lipidmatrices, 1:1 (m/m) Mischungen von Lecithin und Hartfett verwendet (SRMS100 bzw. SRMS142).

Die Herstellung per Kalthomogenisation unter Stabilisierung mit dem Polymeremulgator Poloxamer 188 (Poloxamer/SRMS 1:2 (m/m)) führt zu inakzeptablen Ergebnissen mit Partikelgrößen von über 500 nm und Polydispersitätsindices von 1. Polydispersitätsindices dieser Größenordnung gelten gemäß Müller und Schuhmann (1996) als nicht auswertbar. Zudem kommt es durch den Emulgator, dessen hohe Konzentration zur Bildung kleiner Partikel dennoch nicht ausreichend ist, zur Ausbildung eines thixotropen Gels.

Kleinere Partikel von weniger als 400 nm Durchmesser mit Polydispersitätsindices von zum Teil unter 0,5, die aber immer noch nicht als zufriedenstellend anzusehen sind, lassen sich unter Verwendung des O/W-Emulgators Polysorbat 80 erzielen. Dabei ist ein PS80/SRMS-Verhältnis von 1:5 (m/m) ausreichend für eine Partikelgrößenreduktion. Der Einsatz höherer Emulgatorkonzentrationen ist nicht gerechtfertigt, zumal durch höhere Konzentrationen bei Verhältnissen von 1:3,3 oder 1:2 (m/m) das Irritationspotential bei topischer Applikation steigt. Da geringere Emulgatorkonzentrationen bei einem PS80/SRMS-Verhältnis von 1:10 (m/m) zu deutlich größeren Partikeln und breiteren Verteilungen führen und es zudem zur Bildung halbfester Systeme kommt, wird für die weitere Optimierung des Systems ein Verhältnis von 1:5 (m/m) zu

Grunde gelegt. Westesen und Siekmann (1997) erklären die Ausbildung cremeartiger Systeme mit einer unvollständigen Benetzung von Kristalloberflächen durch zu geringe Emulgatormengen oder durch einen sogenannten langsamen Emulgator. Im letztgenannten Fall werden neu geschaffene Oberflächen langsamer besetzt als die Agglomeration der Partikel erfolgt.

Durch Variation der Temperatur beim Homogenisierprozess kann eine Optimierung der Nanosuspensionen erzielt werden. Durch den Verzicht auf das Eisbad bei der Kalthomogenisation und entsprechend das Durchführen der Hochdruckhomogenisation bei Raumtemperatur können Partikel mit Durchmessern kleiner als 100 nm mit Polydispersitätsindices unter 0,3, d.h. in enger Verteilung, erhalten werden. Die, bei der Produktion von Lipidnanopartikeln meistens angewandte, Heißhomogenisation bei Temperaturen weit oberhalb des Schmelzpunkts des Lipids [Schwarz et al. 1994, Westesen und Siekmann 1994, Müller und Lucks 1996, Ahlin et al. 1998, Müller und Olbrich 1999] ist zur Erzielung zufriedenstellender Nanosuspensionen nicht zwingend erforderlich. Es genügt, eine Kalthomogenisation ohne Kühlung des Homogenisators durchzuführen, wobei die Produkttemperatur durch die Hochdruckhomogenisation selbst, d.h. die dabei entstehende Wärme, im Bereich des Schmelzpunkts des Lipids gehalten wird. Diese schmelzpunktnahe Homogenisation kann durch den Homogenisierdruck kontrolliert werden. Bei einem Druck von 1000 bar wird eine Temperatur in der Nähe des Schmelzpunkts von SRMS100 (34-35 °C) erzielt, der Schmelzpunkt von SRMS142 (42-43 °C) wird bei einem Druck von 1500 bar erreicht. Durch eine Homogenisierungsdauer von 20 Passagen sind in beiden Fällen Partikelgrößen unter 80 nm mit Polydispersitätsindices unter 0,3 möglich, die eine enge Verteilung der Partikel anzeigen. Eine längere Homogenisation führt nicht zu einer deutlichen Verkleinerung der Partikel, zumal der Zustand angeschmolzener Partikel so kurz wie möglich gehalten werden soll, um einen vermehrten Austritt des Lecithins in die wässrige Phase zu vermeiden. Im Unterschied zu anderen Arbeiten, bei denen Lecithin lediglich der Partikelstabilisierung dient [Westesen und Siekmann 1994, Siekmann und Westesen 1994a, Esposito et al. 1995, Müller und Lucks 1996, Westesen und Siekmann 1997, Bunjes et al. 2001], ist in der vorliegenden Arbeit das Phospholipid für die Solubilisation der Arzneistoffe vorgesehen.

5.3 Charakterisierung arzneistofffreier SRMS basierter Nanosuspensionen

5.3.1 Form der Partikel

Optimierte SRMS basierte Nanosuspensionen mit 5 oder 15 % (m/m) SRMS enthalten anisometrische, plättchenförmige Nanopartikel, was den kristallinen Charakter der Partikel unterstreicht. Die plättchenartigen Strukturen sind auch von Siekmann und Westesen (1992, 1994b) beschrieben und lagern sich zum Teil in Agglomeraten von wenigen Partikeln geldstapelartig übereinander [Unruh et al. 1999]. Isometrische Partikel, die auf amorphe Partikel aufgrund unterkühlter Schmelzen [Westesen und Bunjes 1995, Westesen 2000] bzw. auf eine Liposomenformation durch Austritt von Lecithin aus geschmolzenen Lipiden hinweisen würden, können nicht gefunden werden. Die Anisometrie der Partikel wird durch die Bestimmung der intrinsischen Viskosität verdünnter Nanosuspensionen und Ermittlung der Halbachsenverhältnisse nach Adam (1988) bestätigt. Dieses Verhältnis a/b beträgt 19,5 für SRMS100-haltige Systeme und 11,3 für Suspensionen mit SRMS142. Die tendenziell geringere Anisometrie der SRMS142-Partikel kann mit der höheren Kristallisationstemperatur der SRMS142 und damit der geringeren Zeit, die zur Ausbildung anisometrischer Strukturen bei Abkühlung auf Raumtemperatur zur Verfügung steht, erklärt werden.

5.3.2 Kristallinität der Partikel

Das Vorliegen kristalliner Partikel wird durch thermoanalytische Untersuchungen weiter gestützt, wobei die detektierten Schmelzvorgänge bei den Nanosuspensionen etwa 8-9 °C unterhalb der Schmelztemperatur der Bulkmaterialien stattfinden (SRMS100: 26,2 vs. 34,8 °C, SRMS142: 33,7 vs. 42,6 °C). Diese Schmelzpunktdpression ist in Übereinstimmung mit Befunden von Siekmann und Westesen (1994c) sowie Bunjes et al. (2000) auf die kolloidalen Abmessungen der Partikel mit ihrem großen Oberflächen/Volumen-Verhältnis und nicht auf eine niedriger schmelzende α -Modifikation zurückzuführen. Durch die kolloidale Struktur befinden sich mehr Moleküle in einem Zustand höherer Energie in der Partikeloberfläche. Röntgendiffraktometrische Ergebnisse erlauben die Zuordnung der erhaltenen Beugungsmuster unter Berücksichtigung von Literaturdaten [Larsson 1966, Hagemann 1988] zur stabilen β -Modifikation im Fall der Nanopartikel und zur metastabilen β' -Modifikation im Fall der

Bulkmaterialien. Die stabile β -Modifikation sollte prinzipiell einen höheren Schmelzpunkt als die metastabile β' -Modifikation aufweisen. Die beobachtete Schmelzpunktdepression der Nanosuspensionen gegenüber dem Bulkmaterial von 8-9 °C ist auf einen ausgeprägten Partikelgrößeneffekt zurückzuführen.

Eine Zunahme der Schmelztemperaturen um 1-2 °C unter Lagerung geht einher mit einer Partikelgrößenzunahme von 70-80 nm auf über 100 nm in den ersten neun Tagen nach der Herstellung. Diese Partikelgrößenzunahme ist wahrscheinlich auf die oben beschriebene „geldstapelartige“ Agglomeration weniger Partikel zurückzuführen, die durch ein neutrales Zetapotential beider Systeme (15 % (m/m) SRMS100 oder SRMS142) begünstigt ist. Eine Zunahme der Partikelgrößen ist jedoch nicht in allen Untersuchungsreihen zu beobachten.

5.3.3 Rheologische Untersuchungen der Nanosuspensionen

Arzneistofffreie, 15 % (m/m) Lipidphase enthaltende Nanosuspensionen zeigen trotz der Anisometrie der Partikel ein idealviskoses Fließverhalten mit einer Viskosität von etwa 6 mPas (bei $\tau=2$ Pa). Nach Zusatz von 0,05 % (m/m) Carbopol 980 kommt es zum pseudoplastischen Fließen ($\eta_i=24-28$ mPas, $\tau=2$ Pa), das nach pH-Neutralisation noch ausgeprägter mit höheren Viskositäten erscheint. Ein neutralisiertes, CP980-haltiges SRMS100-System besitzt bei $\tau=2$ Pa eine Viskosität von 44 mPas, während das äquivalente SRMS142-System eine Viskosität von 158 mPas aufweist. Dieser deutliche Unterschied kann derzeit nicht interpretiert werden. Die Partikelgrößen nehmen durch den Zusatz des Polymers um etwa 20 nm zu, was mit einer Anlagerung der Polyacrylsäure an die Partikel erklärt werden kann.

Oszillationsrheologische Untersuchungen zeigen, dass bereits die arzneistofffreien Nanosuspensionen ohne viskositätserhöhenden Polymerzusatz verstärkte Interaktionen mit einer Mucin-Dispersion eingehen. In Analogie zu Rossi et al. (1995) wird dies durch einen signifikanten, überadditiven Anstieg des elastischen Moduls G' sowie des viskosen Moduls G'' einer System/Mucin-Mischung gegenüber der Summe der Einzelkomponenten System/simulierte Tränenflüssigkeit und Mucin/simulierte Tränenflüssigkeit festgestellt. Obwohl die überadditive Steigerung bei beiden Parametern, d.h. G' und G'' , beobachtet werden kann, wird in der vorliegenden Arbeit nur ein G'' basierter mucoadhäsiver Index kalkuliert, da alle Systeme mit einem Pha-

senwinkel δ von über 80° vermehrt viskose Anteile besitzen. Die relative Steigerung von G'' gegenüber der Summe der Einzelkomponenten beträgt 200-300 % und wird durch den Zusatz von Polyacrylsäure nicht weiter erhöht.

Die vermehrten Interaktionen sind dabei gemäß Ferry (1970) physikalischer Art, da G'' sehr viel größer als G' ist und entsprechend δ einen Wert größer als 80° besitzt. Es liegt also ein viskoses System und kein gelartiges Netzwerk aus mucoadhäsivem Agens und Mucin vor, das normalerweise eine echte Mucoadhäsion kennzeichnet. Die meisten Autoren verwenden daher zur Bestimmung der Mucoadhäsion den elastischen Modul G' [Mortazavi et al. 1993], da der viskose Modul G'' nach Einschätzung von Caraviella et al. (1992) für eine Unterscheidung mucoadhäsiver Polymere weniger aussagekräftig sein soll.

Nichtsdestotrotz ist am Applikationsort Auge durch Interaktionen zwischen der cornealen Mucin-Schicht und den Nanosuspensionen eine erhöhte Verweilzeit der nanopartikulären Augentropfen zu erzielen. Diese Interaktionen sind evtl. auf oberflächlich auf den Nanopartikeln lokalisiertes Lecithin zurückzuführen, das mit charakteristischen funktionellen Gruppen des Mucins, wie den in der Literatur beschriebenen Sialinsäuregruppen [Argüeso und Gipson 2001], wechselwirken kann. Dabei dürfte zwar kein Netzwerk aufgebaut werden, da die Bindungen wahrscheinlich nicht stark genug sind, aber es müsste durch vermehrte innere Reibung eine Viskositätserhöhung erzielt werden.

5.4 Arzneistoffbeladung und Charakterisierung arzneistoffhaltiger SRMS basierter Nanosuspensionen

5.4.1 Herstellung der Nanosuspensionen und Bestimmung ihrer Beladungskapazität

Während der Herstellung pilocarpinhaltiger Nanosuspensionen mit einer Arzneistoffkonzentration analog derjenigen in den Solubilisationsversuchen (6,5 % (m/m) in der SRMS) diffundiert der Arzneistoff aufgrund seiner Hydrophilie vermehrt in die wässrige Phase. Dies führt zu einem hypertonen System mit basischem pH, weswegen eine Rezepturanpassung nötig ist, die die Verwendung eines Phosphatpuffers beinhaltet. Auch estradiolhaltige Rezepturen müssen angepasst werden, da es bei Einsatz einer, entsprechend der Ergebnisse der Solubilisationsuntersuchungen gewählten, hohen Konzentration von 8,0 % (m/m) in der SRMS aufgrund der extrem

schlechten Wasserlöslichkeit zu Ausfällungen während der Herstellung kommt. Der Grund hierfür liegt wahrscheinlich in der Rekristallisation der Lipidmatrix in der höher geordneten β -Modifikation und einer daraus folgenden Umverteilung des Estradiols aus den Nanopartikeln in die wässrige Außenphase. In der unmittelbaren Partikelumgebung sollten temporär übersättigte Lösungen entstehen, die zur Ausfällung neigen. Eine Reduktion auf 0,7 % (m/m) Estradiol in der SRMS (0,1 % (m/m) gesamt) führt zu akzeptablen Nanosuspensionen mit Partikelgrößen bis 140 nm und einem PI unter 0,3. Ein gleich gutes Ergebnis wird bei Verwendung von 3,0 % (m/m) Hydrocortison in der SRMS (0,5 % (m/m) im Gesamtsystem) erreicht.

Wie im Zusammenhang mit der Bildung einer hypertonen Außenphase schon angedeutet, ist die Beladungskapazität der Nanopartikel für Pilocarpin niedrig (35-40 % bei 1,0 % (m/m) PB Gesamtgehalt), da die Diffusion ins wässrige Dispersionsmedium während der Hochdruckhomogenisation entsprechend groß ist. Für schwer wasserlösliche Arzneistoffe, wie Estradiol und Hydrocortison, ist die Verkapselungsrate mit etwa 97 % (bei 0,5 % (m/m) HC gesamt) bzw. 99 % (bei 0,1 % (m/m) EST gesamt) allerdings sehr hoch, weswegen die entwickelten Nanosuspensionen für diese Art von Arzneistoffen ein geeignetes Drug Carrier System darstellen. Andere Autoren berichten von 5 % (m/m) inkorporierbarem Betamethasonvalerat in einer Matrix, die aus reinen Triglyceriden besteht [Westesen et al. 1997]. Dabei kommt es aber im Fall von Betamethasonvalerat bei der Suspensionsherstellung zur Kristallbildung, während Diazepam in der gleichen lipidbezogenen Konzentration keine Probleme bereitet. Cortison und Prednisolon können gar nicht in den verwendeten Lipiden gelöst werden [Westesen et al. 1997], hier könnte ein, für die vorliegende Arbeit gewählter, hoher Lecithingehalt in der Matrix Vorteile bieten. Aussagen über gelöste Arzneistoffkonzentrationen in der Außenphase werden von Westesen et al. nicht getroffen. Cavalli et al. (1995) beschreiben die Beladung von Liposphären mit lipophilen Ionenpaaren aus Pilocarpin und Alkylphosphaten mit einem, auf die Lipidphase bezogenen, inkorporierten Gehalt von 5,1-7,5 % (m/m) Arzneistoff. Dieser verkapselte Anteil ist höher als die in dieser Arbeit mit der hydrophileren Pilocarpin-Base ermittelten Werte. Cavalli et al. (2002) berichten auch von 2,5 % (m/m) inkorporierbarem Tobramycin, einem gut wasserlöslichen Aminoglykosid-Antibiotikum [Pharmazeutische Stoffliste 2003], das aber wiederum als lipophiles Ionenpaar eingesetzt wird. Von dem nicht in Wasser, aber sehr gut in Fetten löslichen [Pharmazeutische Stoffliste 2003] Retinol können nach Jennings et al. (2000b) 3,3 % (bezogen auf das Lipid) inkorpo-

riert werden. Das, schlechter in Fetten lösliche, Hydrocortison kann in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe des Lecithins zu mindestens 3,0 % (m/m) in den Partikeln verkapselt werden.

5.4.2 Untersuchungen zur Permeation von Arzneistoffen aus den Nanosuspensionen

Bei Untersuchungen der Permeation von Pilocarpin durch ein humanes, organotypisches Cornea-Konstrukt nach Reichl et al. (2004) können keine Unterschiede zwischen den Nanosuspensionen und einer wässrigen Lösung gleicher Konzentration, wie die der Außenphase der Suspensionen, festgestellt werden. Die Konzentration in der Außenphase ist zu hoch, als dass in der Versuchszeit von sieben Stunden Effekte von nachdiffundierendem Pilocarpin identifiziert werden können.

Im Gegensatz dazu liegt die Permeationsrate von Hydrocortison aus den Nanosuspensionen wesentlich höher als die aus einer wässrigen und einer öligen Lösung, die aufgrund der geringen Löslichkeit des Arzneistoffs entsprechend niedrig konzentriert sind (0,02 % (m/m)). Da die Hydrocortisonkonzentration in der wässrigen Phase der nanopartikulären Systeme aber auf gleichem Niveau liegt (etwa 200 µg/ml) kann die Erhöhung des Arzneistoffflux auf eine höhere Löslichkeit bei der Untersuchungstemperatur von 37 °C bzw. eine mögliche Solubilisation in gebildeten Mizellen durch Nachlieferung des Arzneistoffs aus den Nanopartikeln zurückzuführen sein. Die Permeation des Glucocorticoids aus den Nanosuspensionen erfolgt daher nicht verlangsamt, durch die Möglichkeit der Nachdiffusion aus den Partikeln bzw. Tröpfchen kann aber von einer verlängerten Freisetzung ausgegangen werden. Eine tendenziell niedrigere Permeationsrate des Arzneistoffs aus den SRMS142-haltigen Systemen, in Bezug auf Nanosuspensionen mit SRMS100, ist auf eine höhere Viskosität geschmolzener SRMS142-Partikel zurückzuführen. Da beide Systeme bei der Testtemperatur von 37 °C eine Emulsion darstellen, ist die Tröpfchenviskosität aufgrund der längeren Fettsäureketten des S142 erhöht und entsprechend der Diffusionskoeffizient des Hydrocortison in den Partikeln erniedrigt.

Dieser Effekt ist auch bei Vergleich der beiden estradiolhaltigen Nanosuspensionen festzustellen, wobei bei diesen Untersuchungen ein, im Vergleich zu den Systemen mit Hydrocortison, um den Faktor 4 niedrigerer Permeationskoeffizient beobachtet wird, da die Estradiolkonzentration in der Außenphase, aufgrund der quasi Wasserunlöslichkeit des Arzneistoffs, niedriger und die Permeabilität auch verringert ist.

5.4.3 Untersuchungen zur Freisetzung aus estradiolhaltigen Systemen

Parallel zur Permeation durchgeführte Freisetzungsuntersuchungen aus estradiolhaltigen Systemen zeigen, dass die Liberation des Estrogens aus den Nanosuspensionen verzögert stattfindet. In Bezug zu einer, 0,1 % (m/m) Arzneistoff enthaltenden, öligen Lösung ist der Flux erniedrigt, der Diffusionskoeffizient aber erhöht, da bei der Berechnung des Diffusionskoeffizienten die Sättigungslöslichkeit in der wässrigen Außenphase der Nanosuspensionen und nicht die Gesamtkonzentration von 0,1 % (m/m) berücksichtigt wird. Um die Systeme im Gesamten zu vergleichen, wird daher ein normierter Flux J/c_0 kalkuliert, der bei den Nanosuspensionen auch niedriger liegt als bei einer 0,025 %igen (m/m) Lösung des Estradiols in Sesamöl. Diese Konzentration wird in der Therapie der menopausalen Keratokonjunctivitis sicca eingesetzt [Sator et al. 1998]. Wie bei den Permeationsuntersuchungen zeigen die Nanosuspensionen auf Basis der SRMS142 aufgrund der höheren Viskosität der Tröpfchen bei 37 °C eine tendenziell leicht erniedrigte Freisetzungsrate. Diese Tendenz ist nicht mehr bei einer Testtemperatur von 20 °C zu beobachten, bei der die Partikel beider nanopartikulärer Systeme im festen Zustand vorliegen und entsprechend der Arzneistoff immobilisiert vorliegt. Die Freisetzungsrate aus diesen Systemen, im Vergleich zu einer Testtemperatur von 37 °C, ist erniedrigt, was den Rückschluss erlaubt, dass die Freisetzungsrate am Applikationsort durch Wahl der Triglyceride, bezüglich ihrer Schmelzpunkte, steuerbar ist.

Die Liberation des Estradiols aus einer wässrigen Suspension, die eine Depotarzneiform darstellt, liegt auf einem ähnlichen Niveau wie die aus den Nanosuspensionen, obwohl die wässrige Suspension eine, um den Faktor 10, niedrigere Arzneistoffkonzentration in der Außenphase aufweist. Die Freigabe aus den Nanopartikeln findet entsprechend langsamer statt als die Auflösung der Makrokristalle der Estradiolsuspension.

6 Zusammenfassung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Entwicklung von Nanosuspensionen auf Basis erstarrter invers mizellarer Lösungen (SRMS) als ophthalmologisches Drug Delivery System, wobei diese SRMS Mischungen von Lecithin und Hartfett sind.

Physikochemische Parameter, wie der Schmelzpunkt und die Kristallmodifikation, der Hartfette werden durch die Inkorporation des Lecithins nicht verändert, was für die Verwendung als Lipidmatrix für ein disperses System vorteilhaft ist. Andererseits kann gezeigt werden, dass die, von Lecithin in lipophilen Medien gebildeten, inversen Mizellen auch in festem Zustand wenigstens teilweise erhalten bleiben. Aufgrund des inkorporierten Lecithins kann die Solubilisationsrate der untersuchten Modellarzneistoffe in den geschmolzenen Lecithin-Hartfett-Mischungen mit steigendem Lecithin-gehalt linear gesteigert werden, was ein Beleg für Wechselwirkungen zwischen den Arzneistoffen und Lecithinassoziaten ist. Die erstarrten invers mizellaren Lösungen können entsprechend als geeignetes Trägersystem für die Entwicklung von Nanosuspensionen angesehen werden.

Nanosuspensionen, die als Lipidmatrix eine 1:1 (m/m) Mischung von Lecithin und Hartfett besitzen, können mit Partikelgrößen und Partikelgrößenverteilungen in akzeptablen Bereichen unter Verwendung von Polysorbat 80 mittels schmelzpunktnaher Hochdruckhomogenisation hergestellt werden. Eine Kalthomogenisation bei sehr tiefen Temperaturen führt zu schlechten Ergebnissen genauso wie die Verwendung von Poloxamer 188. Die Durchführung einer, das Produkt belastenden, Heißhomogenisation ist aber für die Produktion zufriedenstellender Nanosuspensionen nicht nötig, sondern es genügt, druckkontrolliert im Bereich des Schmelzpunkts der Lipide zu homogenisieren.

Die hergestellten Nanosuspensionen enthalten anisometrische, plättchenförmige Partikel, die zwar aufgrund eines neutralen Zetapotentials zur Agglomeration neigen, dennoch als relativ stabil bezeichnet werden können. Die Partikel kristallisieren dabei in einer stabileren Modifikation als das Bulk, wobei trotzdem eine Schmelzpunktdepression aufgrund des kolloidalen Charakters der Partikel zu beobachten ist.

Die Nanosuspensionen gehen mit Mucin verstärkte Interaktionen physikalischer Art ein, die zu einer überadditiven Steigerung von G'' führen. Obwohl es sich um ein System mit überwiegend viskosen Anteilen handelt, kann eine verlängerte Verweildauer am Auge durch diese Interaktion prognostiziert werden.

Nach Rezepturanpassung bei der Herstellung arzneistoffhaltiger Nanosuspensionen kann für Pilocarpin-Base lediglich eine Beladungskapazität von etwa 40 % (bei 1,0 % (m/m) PB Gesamtgehalt) festgestellt werden, während die schwer löslichen Arzneistoffe Estradiol (0,1 % (m/m) Gesamtgehalt) und Hydrocortison (0,5 % (m/m) Gesamtgehalt) nahezu vollständig in den Nanopartikeln inkorporiert werden. Während die entwickelten Nanosuspensionen für hydrophilere Arzneistoffe wie Pilocarpin nur bedingt geeignet sind, stellen sie für diese schwer löslichen bzw. schlecht wasserlöslichen Arzneistoffe ein effektives wässriges Drug Carrier System mit guter Handhabbarkeit dar.

Aufgrund der hohen Pilocarpinkonzentration in der wässrigen Phase kann kein Unterschied bei der Untersuchung der Permeation durch ein Cornea-Konstrukt, im Vergleich zu einer wässrigen Arzneistofflösung, festgestellt werden. Im Gegensatz dazu permeiert Hydrocortison aus den Nanosuspensionen zwar nicht in einer verlangsamen Weise, das Glucocorticoid sollte aber aufgrund der hohen, in den Partikeln befindlichen, Arzneistoffmenge aus den Systemen über einen längeren Zeitraum freigegeben werden. Für Estradiol kann eine verzögerte Freisetzung des Arzneistoffs aus den Nanosuspensionen, in Bezug zu einer öligen Lösung gleicher Konzentration, festgestellt werden. Bei den Untersuchungen zeigt sich die Tendenz, dass die Permeations- bzw. Freisetzungsraten aus den SRMS142-haltigen Nanosuspensionen gegenüber den SRMS100-Systemen verringert ist. Da die Freisetzung von Estradiol aus den Nanosuspensionen bei Raumtemperatur ebenfalls verlangsamt erfolgt, könnte durch Wahl des Hartfetts, das für die SRMS verwendet wird, eine Steuerung der Arzneistofffreisetzung erzielt werden. Kontrollierender Parameter wäre die Fettsäurezusammensetzung und somit der Schmelzpunkt des Lipids.

Die Nanosuspensionen auf Basis erstarrter invers mizellarer Lösungen (SRMS) sind für schwer lösliche Arzneistoffe ein geeignetes wässriges Trägersystem, das eine verlängerte Verweildauer am Auge bietet und eine Freisetzung inkorporierter Arzneistoffe über einen längeren Zeitraum gewährleistet.

7 Literaturverzeichnis

- Adam G.**, Viskosität von makromolekularen Lösungen, in: Adam G., Läger P., Stark G. (Hrsg.), Physikalische Chemie und Biophysik, Springer-Verlag Berlin (1988) 236-238
- Ahlin P., Kristl J., Smid-Korbar J.**, Optimization of procedure parameters and physical stability of solid lipid nanoparticles in dispersions, *Acta Pharm.* 48 (1998) 259-267
- Argüeso P., Gipson I.K.**, Review. Epithelial mucins of the ocular surface: structure, biosynthesis and function, *Exp. Eye Res.* 73 (2001) 281-289
- Auterhoff H., Knabe J., Höltje H.-D.**, Lehrbuch der Pharmazeutischen Chemie, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart, 13. Auflage (1994)
- Barraquer J., Ruttlán J.**, Mikrochirurgie der Kornea, ein Atlas und Textbuch, Enke-Verlag Stuttgart (1991)
- Bauer K.H., Frömming K.-H., Führer C.**, Lehrbuch der Pharmazeutischen Technologie, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart, 7. Auflage (2002)
- Beck T., Langhage P.**, Auge und visuelles System, *Pharm. Ztg.* 140 (1995) 4578-4590
- Bonomi L., Marchini G., Marraffa M., Bernardi P., De Franco I., Perfetti S., Varotto A., Tenna V.**, Prevalence of glaucoma and intraocular pressure distribution in a defined population. The Egna-Neumarkt Study, *Ophthalmology* 105 (1998) 209-215
- Bottari F., Giannaccini B., Peverini D., Saettone M.F., Tellini N.**, Semisolid ophthalmic vehicles. I. A study of eye irritation in albino rabbits of a series of gel-type aqueous bases, *Il Farmaco* 33 (1978) 424-446
- Bruno R.P., McIlwrick R.**, Microfluidizer[®] processor technology for high performance particle size reduction, mixing and dispersion, in: Müller R.H., Böhm B.H.L. (Hrsg.), Dispersion techniques for laboratory and industrial scale processing, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart (2001) 77-89
- Bunjes H., Westesen K., Koch M.H.J.**, Crystallization tendency and polymorphic transitions in triglyceride nanoparticles, *Int. J. Pharm.* 129 (1996) 159-173
- Bunjes H., Koch M.H.J., Westesen K.**, Effect of particle size on colloidal solid triglycerides, *Langmuir* 16 (2000) 5234-5241

- Bunjes H., Drechsler M., Koch M.H.J., Westesen K.**, Incorporation of the model drug ubidecarenone into solid lipid nanoparticles, *Pharm. Res.* 18 (3) (2001) 287-293
- Bunjes H., Koch M.H.J., Westesen K.**, Influence of emulsifiers on the crystallization of solid lipid nanoparticles, *J. Pharm. Sci.* 92 (7) (2003) 1509-1520
- Caraviella C., Rossi S., Bonferoni M.C., La Manna A.**, A rheometric method for the assessment of polymer mucin interaction, *Controlled Release Society, Proceed. Intern. Sym. Control. Rel. Bioact. Mater.* 19 (1992) 90-91
- Cavalli R., Gasco M.R., Morel S.**, Behaviour of timolol incorporated in lipospheres in the presence of a series of phosphate esters, *S.T.P. Pharma Sciences* 2 (6) (1992) 514-518
- Cavalli R., Caputo O., Gasco M.R.**, Solid lipospheres of doxorubicin and idarubicin, *Int. J. Pharm.* 89 (1993) R9-R12
- Cavalli R., Morel S., Gasco M.R., Chetoni P., Saettone M.F.**, Preparation and evaluation in vitro of colloidal lipospheres containing pilocarpine as ion pair, *Int. J. Pharm.* 117 (1995) 243-246
- Cavalli R., Caputo O., Carlotti M.E., Trotta M., Scarnecchia C., Gasco M.R.**, Sterilization and freeze-drying of drug-free and drug-loaded solid lipid nanoparticles, *Int. J. Pharm.* 148 (1997) 47-54
- Cavalli R., Gasco M.R., Chetoni P., Buralassi S., Saettone M.F.**, Solid lipid nanoparticles (SLN) as ocular delivery system for tobramycin, *Int. J. Pharm.* 238 (2002) 241-245
- Ceulemans J., Ludwig A.**, Optimisation of carbomer viscous eye drops: an in vitro experimental design approach using rheological techniques, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 54 (2002) 41-50
- Chen-Chow P., Frank S.G.**, In vitro release of lidocaine from Pluronic F-127 gels, *Int. J. Pharm.* 8 (1981) 89-99
- Diederichs J.E., Müller R.H.**, Liposome in Kosmetika und Arzneimitteln, *Pharm. Ind.* 56 (1994) 267-275
- Dingler A., Blum R.P., Niehus H., Müller R.H., Gohla S.**, Solid lipid nanoparticles (SLNTM/LipopearlsTM) - a pharmaceutical and cosmetic carrier for the application of vitamin E in dermal products, *J. Microencapsulation* 16 (6) (1999) 751-767
- Dolder R.**, Die Angleichung des pH-Wertes, in: Dolder R., Skinner F.S. (Hrsg.), *Ophthalmika*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart, 4. Auflage (1990) 385-393

- Domb A.J.**, Lipospheres for controlled delivery of substances, United States Patent 5188837 (1993)
- Einstein A.**, Untersuchungen über die Theorie der Brownschen Bewegung, Akademische Verlagsgesellschaft Leipzig (1922) 36-40
- Esposito P., Canal T., Colombo I., Carli F.**, Solid lipid nanoparticles (SLN) containing phospholipids: Assessment of the effect of phospholipid on some colloidal characteristics, Farm. Vestn. 46 (1995) 183-184
- Europäisches Arzneibuch**, 4. Ausgabe, 4. Nachtrag, Deutscher Apotheker Verlag Stuttgart und Govi-Verlag - Pharmazeutischer Verlag Eschborn (2003)
- Ferry J.D.**, Viscoelastic properties of polymers, Wiley New York (1970)
- Fiedler H.P.**, Lexikon der Hilfsstoffe für Pharmazie, Kosmetik und angrenzende Gebiete, Editio Cantor Verlag Aulendorf, 4. Auflage (1996)
- Fischer H., Reimann H.**, Ölige Estradiol-Hemihydrat-Augentropfen 0,025 Prozent, Pharm. Ztg. 144 (1999) 126-128
- Franz T.J.**, Percutaneous absorption. On the relevance of in vitro data, J. Invest. Derm. 64 (1975) 190-195
- Friedrich I., Papantoniou I., Müller-Goymann C.C.**, Physicochemical characterization of a reverse micellar solution after loading with different drugs, Pharmazie 55 (2000) 755-758
- Gareiß J., Hoff E., Ghyczy M.**, Nattermann Phospholipid GmbH, Phospholipide-Liposomen-Nanoemulsionen, Parfümerie und Kosmetik 10 (1994) 652-659
- Gasco M.R., Gallarate M., Trotta M., Bauchiero L., Gremmo E., Chiappero O.**, Microemulsions as topical delivery vehicles: ocular administration of timolol, J. Pharmac. & Biomed. Anal. 7 (1989) 433-439
- Gasco M.R., Cavalli R., Carlotti M.E.**, Timolol in lipospheres, Pharmazie 47 (1992) 119-121
- Gasco M.R.**, Method for producing solid lipid microspheres having a narrow size distribution, United States Patent 5250236 (1993)
- Gasco M.R.**, Solid lipid nanospheres from warm micro-emulsions, Pharm. Technol. Eur. 9 (1997) 52-58
- Gobert L., Risack J., Bienfet V., Bertrand J.**, Mucous and mucolysis, U.C.B. Pharmaceutical Division Brüssel (1984)

Goodings P., High pressure homogenization: Principles and applications based on EmulsiFlex equipment, in: Müller R.H., Böhm B.H.L. (Hrsg.), Dispersion techniques for laboratory and industrial scale processing, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart (2001) 31-44

Grüsser O.-J., Landis T., Visual agnosias and other disturbances of visual perception and cognition, MacMillan Press London (1991)

Hagemann J.W., Thermal behavior and polymorphism of acylglycerides, in: Garti N., Sato K. (Hrsg.), Crystallization and polymorphism of fats and fatty acids, Marcel Dekker Inc New York (1988) 9-95

Hamann H.-J., Wechselwirkungen mesogener Arzneistoffe mit kolloidalen Lecithinassoziaten am Beispiel des Fenoprofens, Dissertation, TU Braunschweig (1990)

Haße A., Keipert S., Development and characterization of microemulsions for ocular application, Eur. J. Pharm. Biopharm. 43 (1997) 179-183

Higuchi W.I., Diffusional models useful in biopharmaceutics. Drug release rate processes. Pharm. Sci. 56 (1967) 315-324

Honegger H., Werry H., Anatomie und Pathophysiologie des Auges mit besonderer Berücksichtigung der lokalen Therapie, in: Dolder R., Skinner F.S. (Hrsg.), Ophthalmika, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart, 4. Auflage (1990) 3-11

Hui H.-W., Robinson J.R., Effect of particle dissolution rate on ocular drug bioavailability, J. Pharm. Sci. 75 (3) (1986) 280-287

Jahnke S., The theory of high-pressure homogenization, in: Müller R.H., Böhm B.H.L. (Hrsg.), Dispersion techniques for laboratory and industrial scale processing, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart (2001) 7-30

Jenning V., Gysler A., Schäfer-Korting M., Gohla S.H., Vitamin A-loaded solid lipid nanoparticles for topical use: Occlusive properties and drug targeting to the upper skin, Eur. J. Pharm. Biopharm. 49 (2000a) 211-218

Jenning V., Schäfer-Korting M., Gohla S., Vitamin A-loaded solid lipid nanoparticles for topical use: Drug release properties, J. Controlled Rel. 66 (2000b) 115-126

Jenning V., Thünemann A.F., Gohla S.H., Characterisation of a novel solid lipid nanoparticle carrier system based on binary mixtures of liquid and solid lipids, Int. J. Pharm. 199 (2000c) 167-177

- Jenning V., Lippacher A., Gohla S.H.**, Medium scale production of solid lipid nanoparticles (SLN) by high pressure homogenization, *J. Microencapsulation* 19 (1) (2002) 1-10
- Kanski J.J., Spitznas M.**, Lehrbuch der klinischen Ophthalmologie, Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York (1987)
- Keipert S.**, Ophthalmika: etablierte Arzneiformen und neue Konzepte, in: Müller R.H., Hildebrand G.E. (Hrsg.), *Pharmazeutische Technologie: Moderne Arzneiformen*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart, 2. Auflage (1998) 77-98
- Keller M.**, Kontaktlinsen - Ursache möglicher Unverträglichkeiten, *Pharm. Ztg.* 126 (1981) 1377-1382
- Kühnel W., Mendoza A.S.**, Morphologie der Cornea, *Fortschr. Ophthalmol.* 84 (1987) 217-224
- Larsson K.**, Classification of glyceride crystal forms, *Acta Chem. Scand.* 20 (8) (1966) 2255-2260
- Liotet S., Van-Bijsterveld O.P., Kogbe O., Laroche L.**, A new hypothesis on tear film stability, *Ophthalmologica* 195 (1987) 119-124
- Lippacher A., Müller R.H., Mäder K.**, Preparation of semisolid drug carriers for topical application based on solid lipid nanoparticles, *Int. J. Pharm.* 214 (2001) 9-12
- Lippold B.C.**, Biopharmazeutische Gesichtspunkte der Arzneimitteltherapie am Auge, *Dtsch. Apoth. Ztg.* 116 (1976) 1511-1514
- Lippold B.C., Steinke G.**, Biopharmazeutische Aspekte der Augenarzneizubereitungen, in: Dolder R., Skinner F.S. (Hrsg.), *Ophthalmika*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart, 4. Auflage (1990) 354-368
- Mackeben S., Müller-Goymann C.C.**, Solubilization of timolol maleate in reversed micellar systems. Measurement of particle size using SAXS and PCS, *Int. J. Pharm.* 196 (2000) 207-210
- Mackeben S., Müller M., Müller-Goymann C.C.**, The influence of water on phase transitions of a drug-loaded reverse micellar solution into lamellar liquid crystals, *Colloids and Surfaces A* 183-185 (2001) 699-713
- www.mannpharma.de**, Internetseiten der Dr. Gerhard Mann GmbH (2004)
- Martin A.N., Swarbrick J., Cammarata A.**, *Physikalische Pharmazie*, Hrsg. Stricker H., Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart, 3. Auflage (1987)

Mehnert W., zur Mühlen A., Dingler A., Weyhers H., Müller R.H., Solid lipid nanoparticles - ein neuartiger Wirkstoff-Carrier für Kosmetika und Pharmazeutika. 2. Mitteilung: Wirkstoff-Inkorporation, Freisetzung und Sterilisierbarkeit, Pharm. Ind. 59 (6) (1997) 511-514

Mehnert W., Mäder K., Solid lipid nanoparticles. Production, characterization and applications, Advanced Drug Delivery Reviews 47 (2001) 165-196

Messmer E.M., Wenn das Auge trocken bleibt: das Sicca-Syndrom und seine Therapie, Pharm. Ztg. 143 (1998) 2001-2008

Moore W.J., Hummel D.O., Viskosität von Polymerlösungen, in: Physikalische Chemie, de Gruyter Berlin (1986) 1170-1174

Mortazavi S.A., Carpenter B.G., Smart J.D., A comparative study on the role played by mucus glycoproteins in the rheological behaviour of the mucoadhesive/mucosal interface, Int. J. Pharm. 94 (1993) 195-201

Müller B.W., Mikroemulsionen als feste Wirkstoff-Trägersysteme, in: Müller R.H., Hildebrand G.E. (Hrsg.), Pharmazeutische Technologie: Moderne Arzneiformen, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart, 2. Auflage (1998a) 161-168

Müller R.H., Mehnert W., Lucks J.-S., Schwarz C., zur Mühlen A., Weyhers H., Freitas C., Rühl D., Solid lipid nanoparticles (SLN) - An alternative colloidal carrier system for controlled drug delivery, Eur. J. Pharm. Biopharm. 41 (1) (1995) 62-69

Müller R.H., Lucks S., Arzneistoffträger aus festen Lipidteilchen (Feste Lipidnanosphären (SLN)), Europäische Patentschrift EP 0 605 497 B1 (1996)

Müller R.H., Rühl D., Runge S.A., Biodegradation of solid lipid nanoparticles as a function of lipase incubation time, Int. J. Pharm. 144 (1996) 115-121

Müller R.H., Schuhmann R., Teilchengrößenmessung in der Laborpraxis, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart (1996)

Müller R.H., Dingler A., Weyhers H., zur Mühlen A., Mehnert W., Solid lipid nanoparticles - ein neuartiger Wirkstoff-Carrier für Kosmetika und Pharmazeutika. 3. Mitteilung: Langzeitstabilität, Gefrier- und Sprühtrocknung, Toxizität, Anwendung in Kosmetika und Pharmazeutika, Pharm. Ind. 59 (7) (1997a) 614-619

Müller R.H., Rühl D., Runge S., Schulze-Forster K., Mehnert W., Cytotoxicity of solid lipid nanoparticles as a function of the lipid matrix and the surfactant, Pharm. Res., 14 (4) (1997b) 458-462

- Müller R.H.**, Feste Lipidnanopartikel (SLN), in: Müller R.H., Hildebrand G.E. (Hrsg.), Pharmazeutische Technologie: Moderne Arzneiformen, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart, 2. Auflage (1998b) 357-366
- Müller R.H., Olbrich C.**, Solid lipid nanoparticles: Phagocytic uptake, in vitro cytotoxicity and in vitro biodegradation. 1st Communication, Pharm. Ind. 61 (5) (1999) 462-467
- Müller R.H., Mäder K., Gohla S.**, Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery - a review of the state of the art, Eur. J. Pharm. Biopharm. 50 (2000) 161-177
- Müller-Goymann C.C., Hamann H.-J.**, Sustained release from reverse micellar solutions by phase transformations into lamellar liquid crystals, J. Controlled Release 23 (1993) 165-174
- Mutschler E.**, Arzneimittelwirkungen, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart, 7. Auflage (1996)
- Niesmann M.R.**, The use of liposomes as drug carriers in ophthalmology, Critical reviews in Ther. Drug Carrier Systems 9 (1992) 1-38
- Papantoniou I., Müller-Goymann C.C.**, Influence of the phase transformation from reverse micellar solution into lamellar liquid crystal on sustained drug release. Part I: Physicochemical characterization of systems containing either diclofenac acid or diclofenac sodium, Pharm. Pharmacol. Lett. 5 (1) (1995a) 28-31
- Papantoniou I., Müller-Goymann C.C.**, Influence of the phase transformation from reverse micellar solution into lamellar liquid crystal on sustained drug release. Part II: Sustained release of diclofenac sodium from reverse micellar solutions via lamellar mesophases, Pharm. Pharmacol. Lett. 5 (2) (1995b) 49-52
- Papantoniou I.**, Invers mizellare Lösungen mit modifizierter Wirkstofffreisetzung durch applikationsinduzierte Transformation in lyotrope Mesophasen, Dissertation, TU Braunschweig (1995)
- Park H., Robinson J.R.**, Mechanisms of mucoadhesion of polyacrylic acid hydrogels, Pharm. Res. 4 (6) (1987) 457-464
- Peters T.**, Vergleich verschiedener Analysenmethoden zur Estradiolbestimmung in wässrigen Lösungen im Hinblick auf Sättigungslöslichkeit, Adsorption und Stabilität, Diplomarbeit, Universität Halle-Wittenberg (2000)
- Pharmazeutische Stoffliste**, ABDATA Pharma-Daten-Service, Eschborn, 13. Auflage (2003)

Quigley H.A., Reappraisal of the mechanisms of glaucomatous optic nerve damage, *Eye* 1 (1987) 318-322

Refai H., Dilution of semisolid preparations. Studies on the parameters affecting hydrocortisone release and permeation through excised human stratum corneum with emphasis on the influence of dilution, Dissertation, TU Braunschweig (2001)

Reichl S., Müller-Goymann C.C., Entwicklung eines organotypischen Kornea-konstruktes als ein In-vitro-Modell für Permeationsstudien, *Ophthalmologie* 98 (9) (2001) 853-858

Reichl S., Entwicklung porciner und humaner organotypischer cornealer Zellkulturmodelle für in vitro Permeationsuntersuchungen, Dissertation, TU Braunschweig (2003)

Reichl S., Bednarz J., Müller-Goymann C.C., Human corneal equivalent as cell culture model for in vitro drug permeation studies, *Br. J. Ophthalmol.* 88 (2004) 560-565

Rohen J.W., Funktionelle Anatomie von Kornea, Episklera und Konjunktiva, in: Kampik A., Grehn F. (Hrsg.), *Das äussere Auge: Hauptreferate der XXXI. Essener Fortbildung für Augenärzte*, Enke-Verlag Stuttgart (1996) 1-12

Rose C., Stabilitätsbeurteilung von O/W-Cremes auf Basis der Wasserhaltigen Hydrophilen Salbe DAB 1996, Dissertation, TU Braunschweig (1999)

Rosevear F.B., The microscopy of the liquid crystalline neat and middle phases of soaps and synthetic detergents, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 31 (1954) 628-639

Rossi S., Bonferoni M.C., Lippoli G., Bertoni M., Ferrari F., Caramella C., Conte U., Influence of mucin type on polymer-mucin rheological interactions, *Biomaterials* 16 (1995) 1073-1079

Rote Liste 2004, Bundesverband der pharmazeutischen Industrie (BPI) e.V., Frankfurt/Main (2004)

Sator M.O., Joura E.A., Golaszewski T., Gruber D., Frigo P., Metka M., Hommer A., Huber J.C., Treatment of menopausal keratoconjunctivitis sicca with topical oestradiol, *Br. J. Obstet. Gynaecol.* 105 (1998) 100-102

Saupe A., Textures, deformations and structural order of liquid crystals, *J. Coll. Interf. Sci.* 58 (3) (1977) 549-558

Schicksnus T., Müller-Goymann C.C., The influence of hydrotropic substances on the UV-detection of 17 β -estradiol, *Proc. 4th World Meeting ADRITELF/APGI/APV*, Florence (2002), 391-392

Schirmer O., Studien zur Physiologie und Pathologie der Tränenabsonderung und Tränenabfuhr, Arch. F. Ophthalmol. 56 (1903) 197

Schmitt J., Parenterale Fettemulsionen als Arzneistoffträger, in: Müller R.H., Hildebrand G.E. (Hrsg.), Pharmazeutische Technologie: Moderne Arzneiformen, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart, 2. Auflage (1998) 189-194

Schneeweis A., Müller-Goymann C.C., In vivo and in vitro diclofenac sodium evaluation after rectal application of soft gelatine capsules enabling application induced transformation (AIT) into a semisolid system of liquid crystals (SSLC) for controlled release, Pharm. Res. 14 (12) (1997) 1726-1729

Schneeweis A., Kontrollierte Wirkstofffreigabe bei rektaler Applikation durch applikationsinduzierte Phasentransformation invers mizellarer Lösungen in flüssigkristalline Systeme, Dissertation, TU Braunschweig (1999)

Schneeweis A., Müller-Goymann C.C., Controlled release of solid-reversed-micellar-solution (SRMS) suppositories containing metoclopramide-HCl, Int. J. Pharm. 196 (2000) 193-196

Schoenwald R.D., Ward R.L., De Santis L.M., Roehrs R.E., Influence of high-viscosity vehicles on miotic effect of pilocarpine, J. Pharm. Sci. 67 (1978) 1280-1283

Schubert M.A., Müller-Goymann C.C., Solvent injection as a new approach for manufacturing lipid nanoparticles - evaluation of the method and process parameters, Eur. J. Pharm. Biopharm. 55 (2003) 125-131

Schwarz C., Mehnert W., Lucks J.S., Müller R.H., Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery. I. Production, characterization and sterilization, J. Controlled Rel. 30 (1994) 83-96

Schwarz C., Mehnert W., Freeze-drying of drug-free and drug-loaded solid lipid nanoparticles (SLN), Int. J. Pharm. 157 (1997) 171-179

Siekman B., Westesen K., Submicron-sized parenteral carrier systems based on solid lipids, Pharm. Pharmacol. Lett. 1 (1992) 123-126

Siekman B., Westesen K., Melt-homogenized solid lipid nanoparticles stabilized by the nonionic surfactant tyloxapol. I. Preparation and particle size determination, Pharm. Pharmacol. Lett. 3 (1994a) 194-197

Siekman B., Westesen K., Melt-homogenized solid lipid nanoparticles stabilized by the nonionic surfactant tyloxapol. II. Physicochemical characterization and lyophilisation, Pharm. Pharmacol. Lett. 3 (1994b) 225-228

Siekman B., Westesen K., Thermoanalysis of the recrystallization process of melt-homogenized glyceride nanoparticles, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 3 (1994c) 159-175

Siekman B., Westesen K., Investigations on solid lipid nanoparticles prepared by precipitation in o/w emulsions, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 43 (2) (1996) 104-109

Sjöström B., Bergenståhl B., Preparation of submicron drug particles in lecithin-stabilized o/w emulsions. I. Model studies of the precipitation of cholesteryl acetate, *Int. J. Pharm.* 88 (1992) 53-62

Sjöström B., Westesen K., Bergenståhl B., Preparation of submicron drug particles in lecithin-stabilized o/w emulsions. II. Characterization of cholesteryl acetate particles, *Int. J. Pharm.* 94 (1993) 89-101

Skinner F.S., Augensalben und Augengele, in: Dolder R., Skinner F.S. (Hrsg.), *Ophthalmika*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart, 4. Auflage (1990) 453-468

Smith A., Hunneyball I.M., Evaluation of poly(lactid acid) as a biodegradable drug delivery system for parenteral administration, *Int. J. Pharm.* 30 (1986) 215-220

Smith P.R., The effects of phospholipids on crystallisation and crystal habit in triglycerides, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* (2000) 122-127

Speiser P., Lipidnanopellets als Trägersystem für Arzneimittel zur peroralen Anwendung, Europäische Patentschrift EP 0167825 (1990)

Stoye I., Permeabilitätsveränderung von humanem Stratum corneum nach Applikation nicht-steroidaler Antirheumatika in verschiedenen kolloidalen Trägersystemen, Dissertation, TU Braunschweig (1997)

Tegtmeyer S., Papantoniou I., Müller-Goymann C.C., Reconstruction of an in vitro cornea and its use for drug permeation studies from different formulations containing pilocarpine hydrochloride, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 51 (2) (2001) 119-125

Thews G., Mutschler E., Vaupel P., Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart, 4. Auflage (1991)

Thoma K., Serno P., Beziehungen zwischen der Schmelzzeitzunahme von Suppositorien und den Eigenschaften der Hartfettgrundmasse. 6. Mitt. über pharmazeutische Probleme bei Suppositorien, *Pharm. Ind.* 45 (2) (1983) 192-196

Thoma K., Serno P., Precht D., Röntgendiffraktometrischer Nachweis der Polymorphie von Hartfett. 7. Mitt. über pharmazeutische Probleme bei Suppositorien, *Pharm. Ind.* 45 (4) (1983) 420-425

- Unruh T., Bunjes H., Westesen K., Koch M.H.J.**, Observation of size-dependent melting in lipid nanoparticles, *J. Phys. Chem. B* 103 (1999) 10373-10377
- Unruh T., Bunjes H., Westesen K., Koch M.H.J.**, Investigations on the melting behaviour of triglyceride nanoparticles, *Colloid. Polym. Sci.* 279 (2001) 398-403
- Vandervoort J., Ludwig A.**, Evaluation of pilocarpine loaded gelatin particles for ophthalmic use, *J. Pharm. Belg.* 54 (1999) 85-86
- Van Haeringen N.J.**, Clinical biochemistry of tears, *Surv. Ophthalmol.* 5 (1981) 84-96
- Vogel W.H., Berke A.**, *Okuläre Pharmakologie: biologische Grundlagen der okulären Arzneimittelwirkungen für Optometristen, Mediziner und Pharmazeuten*, Enke-Verlag Stuttgart (1998)
- Way S.E., Hadgraft J.**, In vitro investigation of the permeation and metabolism of hydrocortisone and hydrocortisone-21-esters, in: Scott R.C., Guy R.H., Hadgraft J., Boddé H.E. (Hrsg.) *Prediction of percutaneous penetration Vol. 2*, BC Technical Services, London (1991)
- Wensor M.D., McCarty C.A., Stanislavsky Y.L., Livingston P.M., Taylor H.R.**, The prevalence of glaucoma in the Melbourne Visual Impairment Project, *Ophthalmology* 105 (1998) 733-739
- Westesen K., Siekmann B., Koch M.H.J.**, Investigations on the physical state of lipid nanoparticles by synchrotron radiation X-ray diffraction, *Int. J. Pharm.* 93 (1993) 189-199
- Westesen K., Siekmann B.**, Solid lipid particles, particles of bioactive agents and methods for the manufacture and use thereof, *Internationale Patentschrift WO 94/20072* (1994)
- Westesen K., Bunjes H.**, Do nanoparticles prepared from lipids solid at room temperature always possess a solid lipid matrix?, *Int. J. Pharm.* 115 (1995) 129-131
- Westesen K., Bunjes H., Koch M.H.J.**, Physicochemical characterization of lipid nanoparticles and evaluation of their drug loading capacity and sustained release potential, *J. Controlled Rel.* 48 (1997) 223-236
- Westesen K., Siekmann B.**, Investigation of the gel formation of phospholipid-stabilized solid lipid nanoparticles, *Int. J. Pharm.* 151 (1997) 35-45
- Westesen K.**, Novel lipid-based colloidal dispersions as potential drug administration systems - expectations and reality, *Colloid Polym. Sci.* 278 (2000) 608-618

Wilisch I.L., Veränderung der kolloidalen Struktur von Lecithinassoziaten bzw. Stratum corneum durch unterschiedliche Ölkomponenten und Fenoprofen im Hinblick auf Arzneistofffreigabe und -permeation durch exzidierte Humanhaut, Dissertation, TU Braunschweig (1994)

Wissing S.A., Müller R.H., Solid lipid nanoparticles (SLN) - a novel carrier for UV blockers, Pharmazie 56 (10) (2001) 783-786

Yakovlev A.A., Lenkevich M.M., Use of pilocarpine impregnated alcohol films in the treatment of glaucomatous patients, Vestn. Oftalmol. 79 (1966) 40

Zimmer A.K., Maincent P., Thouvenot P., Kreuter J., Hydrocortisone delivery to healthy and inflamed eyes using a micellar polysorbate 80 solution or albumin nanoparticles, Int. J. Pharm. 110 (1994) 211-222

Zimmer A., Kreuter J., Microspheres and nanoparticles used in ocular delivery systems, Advanced Drug Delivery Reviews 16 (1995) 61-73

zur Mühlen A., Mehnert W., Drug release and release mechanism of prednisolone loaded solid lipid nanoparticles, Pharmazie 53 (8) (1998) 552-555

zur Mühlen A., Schwarz C., Mehnert W., Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery - Drug release and release mechanism, Eur. J. Pharm. Biopharm. 45 (1998) 149-155

Lebenslauf

Name	Ingo Friedrich
Geburtsdatum	10.07.1972
Geburtsort	Wolfsburg
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch

Schulbildung	1978-1982	Grundschule Brome
	1982-1984	Orientierungsstufe Rühren
	1984-1991	Gymnasium Hankensbüttel
		(allg. Hochschulreife)

Zivildienst	09/1991 - 11/1992	Städtisches Krankenhaus Wittingen, haustechnischer Dienst
--------------------	-------------------	--

Ausbildung	04/1993 - 09/1997	Studium der Pharmazie an der Technischen Universität (TU) Braunschweig
	09/1995	1. Abschnitt der pharmazeutischen Prüfung
	10/1997	2. Abschnitt der pharmazeutischen Prüfung
	12/1997 - 11/1998	Praktisches Jahr in der Bahnhof-Apotheke, Wolfenbüttel
	14/12/1998	3. Abschnitt der pharmazeutischen Prüfung
	17/12/1998	Approbation als Apotheker
	01/1999-09/1999	Diplomarbeit am Institut für Pharmazeutische Technologie, TU Braunschweig, unter Leitung von Frau Prof. Dr. C.C. Müller-Goymann
	11/10/1999	Erlangung des akademischen Grades „Diplompharmazeut“ an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
	10/1999-07/2004	Promotionsarbeit an o.g. Institut unter Leitung von Frau Prof. Dr. C.C. Müller-Goymann
	13/12/2004	Erlangung des Grades „Doktor der Naturwissenschaften (Dr.rer.nat.)“ an der Technischen Universität Braunschweig

berufliche Tätigkeit	01/1999-09/1999	Wissenschaftliche Hilfskraft an o.g. Institut
	10/1999-07/2004	Wissenschaftlicher Mitarbeiter an o.g. Institut
	08/2004-10/2004	Abschluss der Dissertation
	seit 15/10/2004	Laborleiter Pharmazeutische Technologie, Pari GmbH, Starnberg (Aerosol Research Institute, München)

Wissenschaftliche Veröffentlichungen allgemeiner Art

Diplomarbeit

Physikochemische Charakterisierung invers micellarer Lösungen zur ophthalmologischen Anwendung, Halle/Saale, 11. Oktober 1999

Publikationen

Friedrich I. Papantoniou I., Müller-Goymann C.C., Physicochemical characterization of a reverse micellar solution after loading with different drugs, Pharmazie 55 (2000) 755-758

Tagungsbeiträge

Friedrich I., Müller-Goymann C.C., Physicochemical characterization of a reverse micellar solution after loading with different drugs (Poster), 3rd World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics, Pharmaceutical Technology, APV/APGI, Berlin (2000)

Friedrich I., Reichl S., Study on solubility and handling of various original and generic veterinary antibiotics (Vortrag), 18th International Pig Veterinary Society Congress, Hamburg (2004)